

Dottorato di Ricerca in
Biologia Avanzata
XXII° ciclo
Coordinatore Prof. Luciano Gaudio

**Ruolo della chinasi Ca^{2+} /Calmodulina- dipendente di tipo II (CaMKII) nella
cascata enzimatica delle MAPK e nei tumori tiroidei**

Dottorando

Maria Rosaria Rusciano

Tutor

Ch.mo Prof. Luciano Gaudio

Università degli Studi di Napoli “Federico II”

Indice

1 Introduzione	pag 3
1.1 Le chinasi Ca²⁺/calmodulina dipendenti	pag 5
1.2 Ras	pag 12
1.3 Raf	pag 13
1.4 Ret	pag 17
2 Materiali e metodi	pag 21
2.1 Colture cellulari, stimolazioni con la fibronectina, vettori e trasfezioni	pag 21
2.2 Western blot e immunoprecipitati	pag 22
2.3 Attività di CaMKII, inibitori e virus	pag 22
2.4 Rilevamento di BRafV600E e del riarrangiamento RET/PTC	pag 24
2.5 Estrazione di DNA genomico e sequenziamento	pag 24
2.6 Incorporazione di timidina [³H]	pag 24
2.7 Analisi statistiche	pag 25
3 Risultati	pag 26
3.1 CaMKII è costitutivamente attiva nelle cellule di PTC non stimulate	pag 26
3.2 L'attivazione di CaMKII è mediata da un segnale costitutivo	pag 24
 a monte Ca²⁺dipendente	pag 26
3.3 L'attivazione di CaMKII è mediata dalle PLC	pag 27
3.4 RET/PTC e RasV12 attivano CaMKII	pag 27
3.5 CaMKII è necessaria per la fosforilazione di Erk e la proliferazione cellulare	pag 28
3.6 CaMKII è necessaria per la sintesi del DNA in cellule TPC-1	pag 28
3.7 BRafV600E attiva CaMKII attraverso un meccanismo PLC/ca²⁺/calmodulina-	
 dipendente	pag 28
4 Figure e leggende	pag 29
5 Discussione	pag 38
Bibliografia	pag 41

1 Introduzione

I carcinomi papillari della tiroide (PTC) rappresentano il tipo di carcinoma della tiroide più frequente, costituendo più dell'80% delle malignità tiroidee (Sherman , 2003). Infatti il cancro alla tiroide è all'ottavo posto nei casi più comuni di malignità nelle donne (3% di tutti i tumori nelle donne) e tale valore ha raddoppiato la sua prevalenza rispetto a 15 anni fa, quando rappresentava l'1,7% di tutti i tumori, raggiungendo il 14° posto nella lista. Inoltre, l'incidenza del tumore della tiroide è aumentato molto velocemente rispetto ad ogni altro tipo di tumore (3,8% per anno nel periodo 1992-2001). Attualmente, l'incidenza del tumore della tiroide è stimato tra i 5 e gli 8 casi per 10⁵ abitanti per anno nei paesi sviluppati (Akslen et al., 1993; Colonna et al., 2002; Gomez et al.,). Inoltre tra gli uomini, la mortalità per il tumore della tiroide è aumentata molto più velocemente rispetto agli altri tipi di tumore (2,3% per anno nel periodo 1992-2001); (Howe et al., 2001). L'aumentata attività e accuratezza diagnostica, con i tumori della tiroide micro- papillari è aumentato da 15-30 a 45-50% (Leenhardt et al., 2004), e i cambiamenti nei criteri diagnostici WHO (Pathology and Genetics of Tumors of Endocrine Organs edited by R A DeLellis, R V Lloyd, P U Heitz and C Eng. IARC Press, Lyon 2004) hanno certamente contribuito ad una più alta prevalenza dell'istotipo papillifero tra i tumori della tiroide. Comunque un reale aumento dell'incidenza dei PTC non può essere escluso ed è stata attribuito sia ad un aumento di iodio (Farahati et al., 2004) o all'esposizione alle radiazioni. I carcinomi papillari della tiroide sono di solito ben differenziati, come dimostrato dalla loro capacità di captare lo iodio, secernono tireoglobuline (Tg), e sono sensibili all'ormone che stimola la tireotropina (Braverman et al., 2000). Nel 15-20% dei casi essi perdono queste caratteristiche come una conseguenza di una possibile diminuita espressione dei geni di differenziameto della tiroide (per es. tireoperossidasi (TPO), Tg, recettore del TSH (TSH-R) NIS, TTF-1 e Pax-8) (Elisei et al., 1994; Arturi et al., 1998). Il processo di dedifferenziameto è responsabile di una prognosi peggiore in questi PTC e sono di solito insensibili alla radioterapia convezionale con Iodio-131 (Haugen et al., 1999). Questi tumori sono associati con caratteristiche alterazioni genetiche, che sono coinvolte nel processo di iniziazione del tumore. Questi includono i riarrangiamenti dei recettori tirosin chinasi, gli oncogeni RET (Santoro et al., 2002) o NTRK1 (Greco et al., 1992), che portano all'inappropriata espressione delle proteine chimeriche RET/PTC (delle quali esistono numerosi varianti) o TRK, rispettivamente, e l'attivazione costitutiva delle loro attività tirosin chinasiche. Le mutazioni attivanti di Ras, in modo particolare NRas e HRas, sono riscontrate soprattutto nei carcinomi follicolari della tiroide così come nelle varianti follicolari dei PTC

(Esapa et al., 1999; Zhu et al., 2003 Z). Le mutazioni attivanti di BRAF sono le alterazioni genetiche più comuni nei PTC (Kimura et al., 2003; Cohen et al., 2003; Soares et al., 2003). Inoltre, le mutazioni di BRAF sono presenti nei carcinomi scarsamente differenziati o nei carcinomi anaplastici della tiroide. Nel complesso, circa il 70% dei PTC esprime una mutazione in uno di questi geni. Queste mutazioni sono mutualmente esclusive, suggerendo che non c'è alcun vantaggio nell'acquisizione di più di una di queste anomalie nello sviluppo del tumore (Kimura et al., 2003; Soares et al., 2003; Frattini et al., 2004). Tutte queste oncoproteine hanno una proprietà comune nell'attivare il pathway delle MAPK (MEK) e di Erk, che porta all'ipotesi che un inappropriato segnale attraverso questo pathway è un evento critico per il processo di iniziazione e trasformazione del tumore, e presumibilmente per il sostentamento del tumore. La maggior parte dei recettori dei fattori di crescita generano molteplici segnali che regolano la crescita cellulare, la proliferazione e la sopravvivenza, il cui bilancio ha un drammatico effetto sul destino cellulare (Demidenko et al., 2008). Nel laboratorio dove ho svolto il mio progetto di dottorato è già stato dimostrato che in cellule di tiroide normale, l'attivazione delle integrine attraverso la fibronectina (FN) genera differenti segnali che portano all'attivazione di Erk e alla proliferazione cellulare (Illario et al., 2005a; Illario et al., 2005b). Negli stessi studi sono state inoltre mostrate evidenze sperimentali che CaMKII è necessaria per l'attivazione di Raf-1 attraverso Ras nel pathway integrine→Ras→Raf-1→MEK→ERK. Studi più recenti hanno dimostrato che il ruolo di CaMKII nella cascata di Erk non è ristretto solo alle integrine ma è piuttosto un fenomeno generale (Illario et al., 2009). CaMKII è una serin-treonin chinasi coinvolta in numerosi segnali e funzioni biologiche. E' un enzima multimerico composto da 10-12 subunità catalitiche, la cui attivazione richiede il legame al complesso Ca^{2+} /calmodulina (Means AR, 2000). Io ho esteso tale studio ai PTC per determinare se CaMKII gioca un ruolo in tale neoplasia. I risultati ottenuti dimostrano che CaMKII è costitutivamente attiva nei PTC attraverso un segnale a monte. CaMKII è attivata da RET/PTC e media il segnale oncogenico che porta all'attivazione di Erk e alla proliferazione cellulare.

1.1 Le chinasi Ca^{2+} /calmodulina-dipendenti

Il calcio (Ca^{2+}) è il secondo messaggero universale nelle cellule eucariotiche. I cambiamenti della concentrazione del Ca^{2+} intracellulare giocano un ruolo fondamentale in molte funzioni cellulari come la trascrizione, il ciclo cellulare, l'apoptosi, l'esocitosi, la sintesi delle proteine e la motilità, e spesso hanno ruoli diversi all'interno della singola cellula (Anderson et al., 1998). Le cellule tipicamente mantengono la concentrazione del Ca^{2+} intracellulare a livello di 10^{-7} M, che è 10^4 volte più bassa rispetto al livello all'esterno della cellula, sequestrando il Ca^{2+} in molti organelli intracellulari (Hudmon A, and Schulman H, 2002). Le cellule hanno un intricato network attraverso cui controllano i livelli di Ca^{2+} citoplasmatico. Le pompe del Ca^{2+} ATP dipendenti trasportano il calcio nei suoi due maggiori depositi, il reticolo endoplasmatico (ER) e lo spazio extracellulare (Hook S, 2001.). Differenti segnali stimolano sia le onde che i picchi della concentrazione intracellulare di calcio fino ad una concentrazione di 10^{-4} M. La sorgente di calcio dipende dallo stimolo. I recettori tirosin chinasi e i recettori accoppiati alle proteine G aumentano i livelli della concentrazione di questo ione producendo inositolo 1,4,5 trifosfato (IP_3), che induce il rilascio di Ca^{2+} dall'ER attraverso il recettore dell' IP_3 (Berridge, 1993). In modo simile il ribosio ADP ciclico può indurre il rilascio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari. I canali ionici ligando dipendenti e voltaggio dipendenti iniziano il processo di rilascio del calcio nella membrana plasmatica attraverso i depositi extracellulari. Il principale recettore intracellulare del Ca^{2+} è la Calmodulina (CaM), un piccolo, e altamente conservato sensore del Ca^{2+} che è ubiquitinariamente espresso nelle cellule mammifere (Bito, 1998). La CaM funziona come recettore per sentire i cambiamenti della concentrazione del Ca^{2+} , e in questo modo, media il ruolo di secondo messaggero di questo ione. Il Ca^{2+} si lega alla CaM attraverso un motivo strutturale chiamato EF-hand, e un paio di queste strutture sono localizzate in entrambe le estremità globulari della proteina. Quando quattro di questi siti di legame sono riempiti, la CaM va incontro ad un cambiamento conformazionale esponendo una flessibile elica ad otto giri di α elica, che separa il pacchetto idrofobico presente in ogni estremità globulare della proteina. La CaM diventa quindi caricata con il calcio e capace di interagire con uno dei suoi principali bersagli nella cellula. L'interazione con le proteine bersaglio è rapidamente reversibile dopo la diminuzione della concentrazione del calcio (Means, 2000). Una delle maggiori famiglie di effettori del complesso Ca^{2+} /CaM è rappresentata dalle protein chinasi Ca^{2+} /CaM dipendenti (CaMKs) che possono essere divise in CaMKs che fosforilano un singolo e specifico substrato come la chinasi delle catene leggere

della miosina (MLCK) e CaMKs multifunzionali includendo CaMKI, CaMKII e CaMKIV, che fosforilano un ampio numero di proteine (Braun and Schulman, 1995). Le CaMKs mostrano delle caratteristiche proprietà regolatorie. La loro struttura presenta una porzione regolatoria contenente un dominio autoinibitorio che interagisce con un dominio catalitico e mantiene inattivo l'enzima a livelli di riposo di calcio. Secondo questo modello di inibizione intrasterica (Cruzalegui et al., 1992), il legame al complesso $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ alla regione adiacente del dominio autoinibitorio causa un cambiamento conformazionale che permette l'accesso del suo substrato e dell'ATP al dominio catalitico. Quindi le CaMKs possono rapidamente sentire l'aumento del calcio intracellulare diventando attive dopo il legame del complesso $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. In più alcuni di questi enzimi hanno un meccanismo che li rende capaci di prolungare la loro attività anche dopo che la concentrazione di calcio è tornata ai livelli basali. Questa memoria molecolare è documentata per CaMKII, un enzima multimerico composto da 10-12 subunità. Ciascuna subunità è un polipeptide di 50-60 KDa contenente un dominio N-terminale catalitico, uno centrale autoinibitorio e la regione di legame alla CaM e il dominio C-terminale responsabile per la multimerizzazione e la localizzazione intracellulare. Un diagramma linearizzato della struttura di CaMKII è mostrato in figura 1. La caratteristica struttura multimerica di CaMKII permette una rapidissima autotransfosforilazione di ciascuna subunità all'interno del complesso. Come conseguenza dell'autotransfosforilazione nella Thr 286, ogni subunità acquista un'attività indipendente dal complesso $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Miller and Kennedy, 1986). Inoltre, aumenta l'affinità di ciascuna subunità per la CaM, rendendola più sensibile ad ulteriori aumenti di calcio (Anderson and Kane, 1998). Queste caratteristiche di CaMKII permettono all'enzima di restare attivo per un po' di tempo dopo che i livelli di Ca^{2+} sono scesi al di sotto della soglia di attivazione, il che spiega il motivo per cui l'attività CaMKII è stimolata anche dalle oscillazioni di calcio (De Koninck and Schulman, 1998). L'attività di CaMKI e CaMKIV, che agiscono come enzimi monometrici, è modulata anch'essa attraverso fosforilazioni. Comunque, rispetto a CaMKII, gli eventi di fosforilazione regolatoria sono catalizzati da un distinto gruppo di chinasi chiamate CaM chinasi chinasi (CaMKK) (Soderling, 1999.). Le CaMKK a loro volta sono enzimi $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ dipendenti. Esse fosforilano CaMKI e CaMKIV legate a $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$.

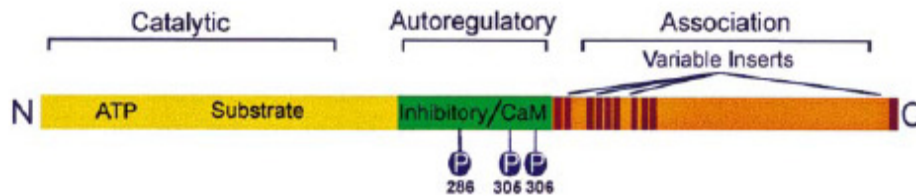


Figura 1 Diagramma lineare di un prototipo di subunità di CaMKII

Il dominio catalitico è autoinibito da una pseudosubstrato sequenza autoregolatoria che è disinibita dal legame $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Questo dominio di associazione dà luogo alla forma nativa dell'enzima, un oloenzima multimerico composto da 8-12 subunità. Nella regione autoregolatoria sono mostrati i siti di autofosforilazione situati nel loop di attivazione.

Questi eventi di fosforilazione causano l'aumento dell'attività di CaMKI e CaMKIV (Chatila et al., 1996.). Oltre agli aspetti dell'attivazione, le CaMKs differiscono nella distribuzione tissutale e subcellulare. CaMKI e CaMKII sono ubiquitariamente espresse, mentre CaMKIV è tessuto specifica ed è espressa principalmente nel cervello, nel timo, nei testicoli, nell'ovaio, nel midollo osseo e nelle ghiandole adrenali (Wang et al., 2001). Mentre CaMKIV è principalmente nucleare (Jensen et al., 1991) e CaMKI sembra essere sia citoplasmatica che nucleare (Picciotto et al., 1996), la distribuzione subcellulare di CaMKII può variare (Heist and Schulman, 1998.). Alcune caratteristiche di CaMKI, CaMKII e CaMKIV sono mostrate in Tabella 1.

Sono state identificate quattro tipi di subunità di CaMKII (α , β , γ , δ) che sono codificate da differenti geni con una diversa espressione tessuto-specifica. Uno splicing alternativo all'interno della sequenza C-terminale di ciascun gene produce ulteriori isoforme. Sebbene le caratteristiche biochimiche di CaMKII purificata da differenti tessuti siano praticamente identiche, la composizione delle subunità, che dipende dalla sorgente, sembra determinare la localizzazione subcellulare del complesso. Le forme più studiate di CaMKII nel sistema nervoso sono ricche nelle subunità α e β , e sono soprattutto enzimi citoplasmatici. Alcune varianti di splicing dei geni di CaMKII α , γ e δ contengono un segnale di localizzazione nucleare (NLS) (Brocke et al., 1995; Srinivasan et al., 1994), che dà luogo ad un targeting della chinasi nel nucleo. L'espressione dell'isoforma δ insieme con le isoforme citoplasmatiche di CaMKII può dirigere il complesso enzimatico multimerico verso il nucleo, suggerendo che l'abbondanza relativa delle subunità citoplasmatiche o di quelle trasportate nel nucleo, può determinare la localizzazione subcellulare (Heist et al., 1998). L'ingresso nel nucleo di CaMKII può anche essere regolato da altre chinasi. In tutte le isoforme nucleari mammifere di CaMKII, la NLS è seguita da una serie di quattro residui di Ser. La fosforilazione delle quattro Ser da

parte di CAMKI o CaMKIV blocca sia la trasloca zone nucleare della subunità α che il legame ad una importina (Griffith et al., 2003). Un'altra caratteristica di CaMKII è la sua associazione in un complesso

multimerico. L'enzima omomultimerizza attraverso il dominio di associazione per formare un oloenzima di 8-12 subunità. All'interno del dominio regolatorio esiste un dominio autoinibitorio che si sovrappone al dominio di legame con la CaM. In assenza di Ca^{2+} /CaM, CaMKII è inibita intrastericamente dalla regione autoinibitoria, che si pensa che prevenga sia il legame al substrato che all'ATP. Il legame a Ca^{2+} /CaM allontana il dominio autoinibitorio il che porta ad una disinibizione della chinasi. Una volta attivata da Ca^{2+} /CaM, CaMKII si autofosforila sulla Thr 286 localizzata nel dominio regolatorio. Questo evento ha due importanti conseguenze: primo, l'affinità dell'enzima per Ca^{2+} /CaM aumenta in un processo chiamato "CaM trapping"; secondo, il dominio autoinibitorio è ulteriormente allontanato rendendo CaMKII parzialmente indipendente da Ca^{2+} /CaM o una autonoma autofosforilazione avviene tra due subunità adiacenti in un oloenzima attraverso una reazione intersubunità (Hudmon and Schulman, 2002.) (Figura 2)

	CaMKI	CaMKIV	CaMKII
Distribuzione tissutale	Ubiquitaria	Tessuto specifica: cervello, cellule T, testicoli, cellule mieloidi, surrene	Ubiquitaria
Localizzazione subcellulare	Citoplasmatica	Nucleare e citoplasmatica	Citoplasmatica, le forme α_B , γ_A , δ_B possono essere nucleari
Subunità	Monomerica	Monomerica	Omo- o eteromultimerica
Necessari per la completa attivazione	Legame al complesso Ca^{2+}/CaM , autofosforilazione del loop di attivazione	Legame del complesso Ca^{2+}/CaM , autofosforilazione, del loop di attivazione	Legame al complesso Ca^{2+}/CaM
Otengono indipendenza dal complesso Ca^{2+}/CaM	No	Sì (fino al 20% dell'attività Ca^{2+}/CaM dipendente)	Sì (con autofosforilazione; fino all'80% dell'attività Ca^{2+}/CaM dipendente)
Inibizione da KN93	0,8 μM	3 μM	0,8 μM

Tabella 1 Proprietà delle chinasi Ca^{2+}/CaM dipendenti

CaMKII ha molteplici funzioni biologiche come la regolazione dell'espressione genica, il ciclo cellulare, la proliferazione e numerose funzioni neuronali. CaMKII è una delle più abbondanti proteine espresse nel cervello, rappresentando circa l'1% delle proteine totali e il 2% nell'ippocampo, una regione associata alla memoria. La prima isoforma di CaMKII ad essere stata identificata, CaMKII α , è uno dei principali componenti nella membrana postsinaptica (PSD) nei neuroni piramidali. Nella PSD, CaMKII si pensa che aumenti l'intensità sinaptica fosforilando i canali ionici e le proteine di segnale come i recettori del glutammato e i recettori NMDA (Cruzalegui and Bading, 2000).

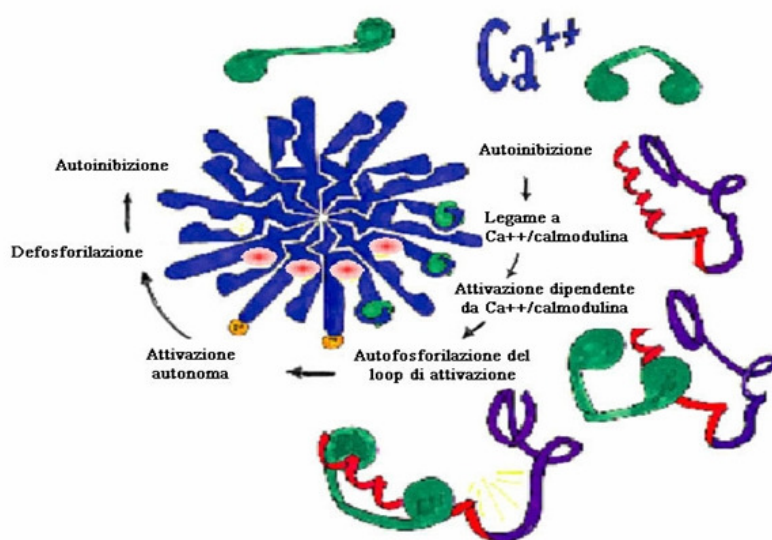


Fig. 2 Rappresentazione schematica del meccanismo di attivazione di CaMKII (Means A. R. 2000)

Nei neuroni ippocampali, è stato proposto che la stimolazione dei recettori NMDA regola l'associazione di CaMKII tra l'F-actina e la PSD in maniera dinamica. Inoltre, CaMKII è coinvolta sia nel mantenimento dell'architettura dendritica che nella plasticità sinaptica. In aggiunta CaMKII è necessaria per i cambiamenti a lunga durata nell'intensità sinaptica come il potenziamento a lungo termine (LPT), un processo coinvolto nell'apprendimento e nella memoria (Giese et al., 1998). CaMKII esercita molti ruoli modulatori nei neuroni oltre all'induzione del LTP, incluse funzioni presinaptiche come la sintesi di neurotrasmettitori, la secrezione di neurotrasmettitori, il disassemblaggio dei microtubuli e funzioni postsinaptiche come la fosforilazione di numerose proteine e chinasi.

Mentre i ruoli di CaMKII nella membrana e nel citoscheletro cominciano a d essere chiari, le funzioni nucleari di CaMKII restano oscure. La maggior parte degli studi indirizzati sulle funzioni nucleari di CaMKII hanno rivelato che l'overspressione della forma troncata al dominio C-terminale e Ca^{2+} /CaM- indipendente di CaMKII altera la trascrizione. Uno dei primi paradigmi ad essere stato analizzato è stato quello della stimolazione attraverso il Ca^{2+} dei geni precoci che sono regolati dall'elemento di risposta al cAMP (CRE) come c-fos . La fosforilazione della proteina che lega CRE (CREB) nella Ser133 è essenziale per la trascrizione dal momento che è necessaria per il legame delle proteine che legano CREB CBP e p300. (De Cesare et al., 1999). La Ser133 è stata originariamente descritta come bersaglio della protein chinasi A (PKA), e questo spiegava il ruolo del cAMP nell'attivazione trascrizionale. Comunque anche CaMKII può fosforilare questo residuo il che fa pensare che CaMKII potrebbe mediare la richiesta di Ca^{2+} necessario per l'espressione dei geni precoci della trascrizione. Comunque mentre la forma troncata di CaMKII può stimolare la trascrizione

mediata da CREB in alcune cellule, essa risulta inibitoria in altre. Sun et al. (Sun et al., 1994) hanno scoperto che un possibile meccanismo inibitorio è che CaMKII, oltre a fosforilare Ser133, può anche fosforilare Ser142. Inoltre la fosforilazione di Ser142 non solo è inibitoria, ma è anche dominante e può revertire l'attivazione di CREB dovuta alla sua fosforilazione sulla Ser133 da parte di PKA. Il meccanismo attraverso cui la fosforilazione di Ser142 inibisce la trascrizione mediata da CREB sembra avvenire attraverso la associazione destabilizzante tra CREB e CBP (Parker et al., 1998). La natura dell'effetto di CaMKII sulla trascrizione sembra essere dipendente sia dalla cellula che dal promotore. Mentre CaMKII inibisce la trascrizione del gene per l'interleuchina 2 nelle cellule umane T (Nghiem et al., 2002), è stato trovato che essa stimola l'espressione del gene del fattore atriale natriuretico (ANF) nei miociti ventricolari (Ramirez et al., 1997). Gli elementi regolatori sensibili a CaMKII includono C/EBP β , CRE, SRE, e AP1 (Means et al., 1991). E' stato anche studiato il ruolo di CaMKII nel ciclo cellulare e nella proliferazione cellulare. Morris et al. hanno dimostrato che CaMKII media la progressione in fase G Ca^{2+} /CaM-dipendente nei fibroblasti mammiferi influenzando i livelli della ciclina D1. Inoltre, l'inibizione di CaMKII endogena attraverso il KN93 previene completamente la sintesi del DNA e porta ad una diminuzione dei livelli di ciclina D1, una molecola regolatoria della protein chinasi cdk4 della fase G1 (Morris et al., 1998).

Studi più recenti mostrano che CaMKII regola la proliferazione cellulare in differenti linee cellulari. (An et al., 2007; House et al., 2007; Muthalif et al., 2001) Illario et al. hanno dimostrato per la prima volta che CaMKII è un mediatore cruciale nel pathway Ras/Erk (Illario et al., 2003).

Nelle cellule tiroidee, la stimolazione delle integrine attraverso la fibronectina attiva nello stesso momento due pathway di segnale: Ras/Raf/Mek/Erk e Ca^{2+} /CaMKII. Entrambi i segnali sono necessari per stimolare la fosforilazione di Erk e la proliferazione cellulare dal momento che l'inibizione del pathway di segnale Ca^{2+} /CaMKII attraverso gli inibitori della CaM o di CaMKII inibisce completamente la fosforilazione di Erk indotta dalla fibronectina. Il meccanismo attraverso cui CaMKII modula l'attivazione di Raf-1 non è del tutto chiaro. Nelle cellule tiroidee stimulate con fibronectina, CaMKII attivata lega Raf-1. Questo evento sembra essere necessario per la successiva attivazione di Mek/Erk. (Illario et al., 2005)

1.2 Ras

Ras è una piccola G-protein ad attività GTPasica, e pertanto in grado di idrolizzare il GTP in GDP. La sua attivazione è un evento che consegue la stimolazione di diversi recettori, da quelli associati a G-protein, ai recettori tirosino-chinasici: in seguito ad attivazione Ras si localizza sotto la membrana cellulare, dove induce l'assemblaggio di un complesso proteico che include una serie di adattatori molecolari e proteine di segnale tra le quali Raf, responsabili della trasduzione del segnale a valle.

Ras è dunque uno dei principali mediatori della cascata di segnali intracellulari che vanno dalla membrana al nucleo, tra i cui effetti finali vi è quello di indurre proliferazione e differenziamento cellulare. Tali eventi vedono le mitogen-activated protein kinases (MAPK) come l'elemento centrale nella regolazione di numerose e importanti risposte cellulari, tra cui l'attivazione di fattori di trascrizione, la sintesi proteica, il ciclo cellulare e l'apoptosi.

Il segnale attivato da Ras è organizzato secondo un sistema di fosforilazioni a catena che consiste in una MAPK chinasi-chinasi (MEKK), una MAPK chinasi (MEK) e in una MAPK.

Il segnale che porta alla fosforilazione di MAPK può essere attivato attraverso tre sistemi recettoriali di superficie relativamente indipendenti tra loro:

- Recettori accoppiati a proteine G, il cui meccanismo di trasduzione prevede l'aumento della concentrazione di AMP-ciclico come secondo messaggero intracellulare;
- Recettori per fattori solubili di natura glicoproteica e direttamente dotati di attività tirosino-chinasica;
- Recettori non dotati di attività chinasica intrinseca, tra i quali le integrine.

Questi sistemi, attivando una serie di chinasi intermedie, determinano la fosforilazione dei residui di tirosina e treonina di MAPK e quindi la sua attivazione.

L'esistenza di una via intracellulare comune a fattori di crescita ed integrine suggerisce che questi due elementi possano cooperare nell'attivazione degli eventi intracellulari indotti da Ras, quali crescita e differenziamento e fornisce una spiegazione molecolare sia per la regolazione dell'espressione genica.

Esistono tre tipi principali di Ras: N-, H-, K-, che differiscono principalmente tra loro per le modificazioni post-traduzionali al C-terminale.

Ras esiste in uno stato attivo, in cui è legato al GTP, ed uno stato inattivo in cui è legato al GDP. Poiché l'affinità di Ras per il GDP è molto più alta di quella per il GTP, il complesso inattivo Ras-GDP si accumula nella cellula. A seguito dell'attivazione dei segnali recettoriali convergenti su Ras, il livello del complesso Ras-GTP aumenta rapidamente e in modo significativo. La conversione tra la forma legata al GDP e quella legata al GTP è stimolata da

proteine citoplasmatiche che agiscono come GNRF (Guanine Nucleotide Releasing Factors), delle quali quella meglio caratterizzata è SoS. Dopo aver legato il GTP, Ras lo idrolizza con relativa lentezza, ritornando allo stato inattivo di Ras-GDP. L'attività enzimatica di Ras è incrementata da proteine attivanti le GTPasi (GAP)

Ras subisce, inoltre, delle modificazioni post-traduzionali, con l'aggiunta di un gruppo farnesilico al C-terminale, catalizzato dall'enzima farnesil transferasi (Ftasi) mediante il quale la proteina si associa alla membrana plasmatica. Inoltre un gruppo palmitoile è aggiunto all'estremità C-terminale in tre delle quattro isoforme (Kato et al., 1992; Kato, Der, and Buss, 1992).

Ras-GTP attiva una serie di vie a valle, che includono PI3K, Raf, RalGDS, e AF6, il che suggerisce che Ras sia coinvolto in molte funzioni cellulari. La via meglio studiata è quella mediata da Raf, che consiste in una cascata di attivazioni di serina-treonina chinasi che portano all'attivazione di MAPK. (Smith et al., 1990). Mutazioni somatiche in Ras sono molto frequenti in diversi tipi di tumore che rispondono in maniera scarsa ai trattamenti attuali, inclusi il carcinoma del polmone, pancreas, e colon; melanoma e leucemie mieloidi acute (Schubbert et al., 2007). Ras oncogenico è un interessante bersaglio per la scoperta di un farmaco specifico dal momento che la proteina mutante di Ras è una molecola di segnale associata alla membrana ed è espressa ad alti livelli nelle cellule tumorali primarie. Le mutazioni di Ras associate ai tumori di solito alterano gli aminoacidi G12, G13 o Q61. Questi mutanti di Ras mostrano una incontrollata attività delle GTPasi e sono resistenti alle proteine che attivano le GTPase (GAPs). Ras mutato nella sua forma oncogenica si presenta nel 10% dei PTC; esso può legare il GTP ma non può scinderlo. Ras quindi risulta costitutivamente attivo, e attiva costitutivamente anche le proteine a valle come le MAPK. La scoperta di nuovi farmaci si è quindi focalizzata in due aree: (1) bloccare gli enzimi come farnesyl transferasi, che catalizza le modifiche post-traduzionali di Ras che sono essenziali per il trasloco in membrana; (2) sviluppare inibitori delle chinasi a valle come Mek, Akt, mTOR.

1.3 Raf

Raf è stato originariamente identificato come oncogene retrovirale ad attività serin/treonin chinasi (Moelling et al., 1984; Rapp et al., 1983). I geni correlati a v-Raf sono stati presto identificati nell'uomo e comprendono una famiglia di tre isoforme, ARaf, BRaf e CRaf. Tutte le chinasi della famiglia Raf sono composte da tre regioni conservate, CR1, CR2, CR3

(Morrison, Cutler, 1997). Il processo iniziale dell'attivazione di Raf coinvolge l'interazione di Ras attivo legato al GTP con il dominio di legame per Ras (RBD) e il dominio ricco in cisteine di CR1 (CRD), e il successivo reclutamento di Raf verso la membrana per un'ulteriore attivazione (Morrison and Cutler, 1997; Nassar et al., 1995; Vojtek et al., 1993). Il ruolo di CR2 è meno definito; comunque, la fosforilazione di CR2 e di diverse interazioni proteina-proteina attraverso CR2 sembra che siano necessarie per la localizzazione e l'attivazione di Raf (Guan et al., 2000; Morrison et al., 1993; Yao et al., 1995; Zhang et al., 2000; Zimmermann and Moelling, 1999). Delezioni del dominio regolatorio N terminale (CR1 e CR2) sono state trovate in molte forme attivate dei geni di Raf presenti in alcune cellule umane neoplastiche, il che suggerisce che questi domini regolano negativamente Raf (Fukui et al., 1985; Kasid et al., 1987; Shimizu et al., 1985; Stanton Jr and Cooper, 1987). CR3 è il dominio catalitico chinasi di Raf ed è anch'esso soggetto a regolazioni attraverso fosforilazioni. Quindi, la regolazione delle Raf chinasi è un processo complesso che coinvolge interazioni inter- e intramolecolari come fosforilazioni di domini regolatori e catalitici delle proteine (Morrison, Cutler, 1997; Zhang et al., 2000; Zimmermann and Moelling, 1999; Chong et al., 2001; Cutler Jr et al., 1998; Heidecker et al., 1990). Studi su topi knockout per Raf hanno rivelato sia delle caratteristiche comuni che uniche delle isoforme di Raf. (Huser et al., 2001; Mercer et al., 2002; Mikula et al., 2001; Pritchard et al., 1996; Wojnowski et al., 1997; Wojnowski et al., 2000). Per esempio, in topi knockout per CRaf, BRaf può vicariare C-Raf nell'attivazione delle chinasi MAPK/ERK (MEK). Tuttavia questi topi sono molto più sensibili a stimoli apoptotici nonostante la presenza di ARaf o BRaf (Mikula et al., 2001). Esistono anche differenze biochimiche tra le isoforme di Raf. ARaf è un attivatore molto più debole di MEK rispetto a B- e C-Raf. Inoltre A-Raf può attivare solo MEK1 mentre C-Raf è capace di attivare sia MEK1 che MEK2 (Marais et al., 1997; Pritchard et al., 1995; Wu et al., 1996; Morice et al., 1999). Sebbene la struttura primaria sia altamente conservata, le isoforme di Raf hanno proprietà biochimiche e funzionali differenti. Le isoforme di Raf possono anche variare per l'espressione cellula-specifica e la localizzazione subcellulare. Per esempio, BRaf e CRaf sono espresse nel cervello, laddove ARaf non è espressa (Morice et al., 1999). A- e CRaf sono molto espresse nel muscolo, dove BRaf è rintracciabile solo a livelli molto bassi. In aggiunta le chinasi Raf sono anche localizzate in differenti compartimenti subcellulari. Sia A- che CRaf hanno una localizzazione stabile o transiente nei mitocondri, quindi sono implicati nella regolazione dell'apoptosi (Mjewski et al., 1999; Nantel et al., 1999; Wang et al., 1996; Yuryev et al., 2000). B- e C-Raf sono entrambe espresse nei neuroni; tuttavia BRaf è localizzata nei processi dei neuriti e CRaf è perinucleare (Morice et al., 1999). Tutte le chinasi Raf sono attivate da piccole

GTPasi Ras, eventi di fosforilazioni regolatorie e proteine scaffold. La combinazione di tutti questi eventi porta ad una propria attivazione di Raf. Quindi, la complessità dell'attivazione di Raf giace nel fatto che le differenti isoforme di Raf mostrano meccanismi comuni e unici nella regolazione dell'attività di Raf. Il reclutamento di Raf verso la membrana attraverso Ras è l'evento iniziale nel processo di attivazione di raf. Il dominio effettore di Ras legato al GTP lega Raf attraverso due domini in CR1, Il dominio di legame a Ras (RBD) e il dominio ricco in cisteine (CR) (Morrison and Cutler, 1997; Nassar et al., 1995; Vojtek et al., 1993). Il legame di entrambi i siti è necessario per l'attivazione di Raf. Sebbene tutte le isoforme di Ras legano Raf con uguale affinità, le differenti isoforme di Ras attivano le Raf chinasi con diversi gradi. Per esempio, KRas è un più potente attivatore di CRaf rispetto a HRas (Yan et al. 1998). Inoltre, l'attivazione di Raf attraverso Ras dipende anche dalla localizzazione subcellulare delle isoforme di ras attraverso i loro segnali di prenilazione, che funzionano per dirigere le isoforme di Ras verso le membrane con specifici contenuti lipidici (Apolloni et al., 2000; Chiu VK et al., 2002; Choy et al., 1999). Recentemente è stato dimostrato che il segnale di prenilazione su H- e KRas può localizzare queste molecole verso il reticolo endoplasmatico (ER) e la membrana del Golgi, rispettivamente (Chiu et al., 2002). La localizzazione di Ras verso le membrane di questi organelli attiva il segnale delle MAPK con una cinetica differente rispetto al segnale della membrana plasmatica (Chiu et al., 2002). La proteina Rap ha lo stesso dominio effettore di Ras, ma la sua attivazione da luogo a differenti funzioni a valle (Ohtsuka et al., 1999). In maniera molto interessante, Rap attiva BRAf ma inibisce CRAf. Rap lega la CRD di CRAf con una più alta affinità rispetto a Ras (Okada et al., 1999) e esclude Ras dal legame. La sostituzione del CRD in CRAf con quello di BRAf da luogo alla perdita dell'inibizione di CRAf da parte di Rap. Nello stesso modo, la sostituzione del CRD di BRAf con quello di CRAf da luogo all'inibizione di BRAf da parte di Rap. Il meccanismo di inibizione di Rap inoltre suggerisce che il legame con la piccola GTPasi da solo non è sufficiente all'attivazione di CRAf. La famiglia delle piccole GTPasi di Rho sono implicate nell'attivazione di CRAf. La famiglia Rho, che consiste di Rho, Rac e Cdc42, regola le strutture del citoscheletro come le fibre di stress, lamellipodi e fili podi, rispettivamente. Tuttavia tali GTPasi non legano direttamente Raf ma attivano vie di segnale di chinasi a valle. Per esempio, Rho può funzionare attraverso l'attivazione di PKN1, PRK2 e ROCK1, mentre rac e Cdc42 attraverso PAK. Studi dell'attivazione di CRAf hanno portato all'identificazione di siti fosforilati da PAK (S338) che sono necessari per l'attività di CRAf (Chaudhary et al., 2000; Diaz et al., 1997; King et al., 1998; Mason et al., 1999). Consistente con il ruolo di PAK, gli attivatori a monte di Rac e Cdc42 cooperano con Ras per attivare CRAf (Li et al., 2000). Uno studio ha messo in luce che usando

mutanti attivati di Ras con un'addizionale mutazione che compromette l'attivazione di CRaf, ma non il legame a Raf, Rac e Cdc42 attivati sono capaci di recuperare l'attivazione di CRaf. Tuttavia Rac e Cdc42 attivati da soli non sono in grado di attivare CRaf, e la localizzazione alla membrana di CRaf è necessaria per la sua attivazione. Un mutante dominante negativo di Rac è capace di inibire l'induzione dell'attivazione di CRaf da parte di Ras, dato che suggerisce che Rac endogeno è necessario per l'attivazione di CRaf. Osservazioni simili sono state fatte su Rho attivato; tuttavia la chinasi attivata a valle di Rho non è conosciuta. Quindi, appare chiaro che i membri della famiglia Rho sono mediatori critici che contribuiscono indirettamente all'attivazione di Raf indotta da Ras. La fosforilazione è un importante meccanismo attraverso cui è regolata l'attività di Raf. La maggior parte degli studi sulla regolazione di raf si sono focalizzati su CRaf, ma gli studi che coinvolgono BRaf, CRaf e lin45-Raf in *C.elegans* hanno rivelato che esiste un meccanismo conservato di regolazione che coinvolge l'attivazione e l'inibizione attraverso fosforilazioni e de fosforilazioni. Sebbene le chinasi Raf siano strutturalmente conservate tra le isoforme e le specie, esistono differenze uniche nei siti chiave di fosforilazione di ciascuna. Tali differenze spiegano perché BRaf e CRaf siano entrambe attivate da Ras ma possano essere regolate diversamente. L'attivazione di Ras induce la fosforilazione di Raf in numerosi residui; comunque numerosi residui sono fosforilati anche a livello basale, non stimolato. Questi residui coinvolgono S259 e S621 che sono stati originariamente identificati in CRaf (Morrison et al., 1993). La fosforilazione di S259 e S621 crea due siti di legame per 14-3-3 che presumibilmente aiuta a mantenere CRaf in uno stato auto inibito. La fosforilazione nella S621 può avere implicazioni più complesse dal momento che mutazioni di tale residuo portano ad una completa inattivazione della chinasi. CRaf ha quattro siti di fosforilazione che sono Ras-inducibili: S338, Y341, T491 e S494. S338 è il sito di fosforilazione di PAK che si trova nel dominio Nterminale del dominio chinasi ed è critico per l'attivazione di Raf (Chong et al., 2001; Chaudhary et al., 2000; Diaz et al., 1997; King et al., 1998; Mason et al., 1999; Li et al., 2001; Sun et al., 2000). Questo sito è conservato nei Raf di mammiferi e in DRaf di *Drosophila*. Interessantemente, il sito omologo in BRaf, S445, è costitutivamente fosforilato e ciò può spiegare l'attività basale alta di BRaf rispetto a CRaf (Mason et al., 1999). Mutazioni in S338 di CRaf danno luogo ad una riduzione dell'attivazione di Raf indotta dall'EGF, Ras attivato, pathway dei recettori accoppiati alle proteine G muscarinici. La fosforilazione di questo sito indotta da Ras avviene probabilmente attraverso l'attivazione di Ras da parte di PI3K. Un altro sito di fosforilazione è Y341 (Marais et al., 1997; Mason et al., 1999; Fabian et al., 1996; Jelinek et al., 1996; Marais et al., 1995; Stokoe and McCormick, 1997) che si trova anch'esso nel dominio chinasi Nterminale. Y341 è un

sito di fosforilazione di Src e JAK (Fabian et al., 1996; Winston and Hunter, 1995; Xia et al., 1996). In BRaf, questa tirosina è sostituita da un residuo di acido aspartico che può spiegare come mai BRaf può essere totalmente attivato da Ras solo, ma ARaf e CRaf richiedono anche Src per la completa attivazione. Tuttavia, il reclutamento mediato da Ras verso la membrana e l'attivazione di Src non sono gli unici due eventi nel processo di attivazione di Raf. Due siti di autofosforilazione sono stati identificati nel loop di attivazione del dominio chinasi di C-Raf (Chong H et al., 2001). Questi siti sono stati identificati prima in BRaf (T598, S601), dove mutazioni in un residuo di alanina da luogo ad una perdita dell'attività di BRaf indotta dall'EGF e da Ras attivato, così come dagli esteri del forbole e dai recettori muscarinici accoppiati alle proteine G (Zhang and Guan, 2000). Mutazioni di questi siti in BRaf danno luogo ad una attività costitutiva di BRaf che è indipendente da Ras attivato. Nei melanomi maligni umani e in altri tipi di tumori è stata frequentemente riscontrata in BRaf la mutazione V599E (Davies et al., 2002). Questa mutazione associata ai tumori crea una carica negativa prossima al sito di fosforilazione T598 nel loop di attivazione ed è sufficiente ad attivare BRaf.

1.4 RET

Il gene RET (REarranged during Transfection) fu clonato per la prima volta nel 1985, e le sue mutazioni sono associate con la Neoplasia Endocrina Multipla (MEN) di tipo 2A e 2B, con il carcinoma midollare della tiroide e la malattia di Hirschsprung (Megacolon). Il gene RET è spesso mutato nei carcinomi papilliferi della tiroide indotti da radiazioni, e risulta riarrangiato con una serie di partner di fusione, tra i quali D10S170 (H4), ELE1, and NTRK1.

Il protooncogene di RET è situato sul cromosoma 10q11.2 e codifica per un recettore di membrana tirosino-chinasi costituito da tre domini funzionali:

- un dominio extracellulare rappresenta il sito di legame per il ligando
- un dominio idrofobico transmembranale
- un dominio intracellulare chinasi TK

Tale recettore non è espresso in cellule follicolari tiroidee, ma è presente essenzialmente nelle cellule di origine neuroectodermica: nei gangli, in alcune parti del cervello e nelle cellule C della tiroide.

I ligandi di RET sono fattori neurotrofici della famiglia GDNF: il legame al recettore causa la dimerizzazione di RET, autofosforilazione dei residui di tirosina all'interno del dominio intracellulare ed attivazione di diverse cascate di segnale (Ciampi and Nikiforov, 2006).

I riarrangiamenti di RET causano la ricombinazione dei domini che codificano per la chinasi con geni eterologhi, formando oncogeni chimerici: tali riarrangiamenti sono generati dalla fusione della regione 3' del gene di RET con la regione 5' di molteplici geni indipendenti.

L'oncogene che deriva da tali riarrangiamenti viene identificato come RET/PTC (per i carcinomi papillari tiroidei).

Fino ad oggi sono state descritte circa 16 varianti di RET/PTC, con maggiore frequenza si riscontrano RET/PTC1 e RET/PTC3. Numerosi studi condotti su animali transgenici che esprimono RET/PTC1 e RET/PTC3 dimostrano che tali riarrangiamenti inducono la formazione di tumori tiroidei dalle caratteristiche simili ai carcinomi papilliferi umani. (Kodama et al., 2005).

Recentemente è stato dimostrato che l'espressione di RET/PTC in cellule di tiroide normali in coltura primaria riduce l'espressione di alcuni geni specifici della tiroide e caratteristici della tiroide differenziata. Inoltre, gli effetti dell'attivazione di RET/PTC richiedono la trasduzione del segnale attraverso MAPK, e più specificamente richiedono la presenza della chinasi BRAF funzionale che risulta indispensabile per l'attivazione di ERK (Melillo et al., 2005).

L'oncogene RET/PTC1 rappresenta più del 90% di tutti i riarrangiamenti di RET. Il meccanismo che porta alla formazione di tale gene è una inversione cromosomica tra il gene H4 e il gene RET, che si trovano sul braccio lungo del cromosoma 10: il gene RET si trova in prossimità del centromero, invece il gene H4 è in una posizione più distale. La fusione si verifica perché la regione cromosomica che separa i due geni ad un certo punto si rompe, compie una rotazione di 180° e determina la formazione di due geni chimerici: un gene chimerico è formato da RET al 5' e H4 al 3', ed un altro gene presenta H4 al 5' e RET al 3' (Santoro et al., 2006).

Il gene che presenta H4 al 5' risulta costituito dal promotore di H4, e dalla porzione tirosina-chinasica di RET. Il promotore di H4 è un ubiquitario, e quindi risulta funzionale anche nelle cellule follicolari tiroidee; tale fusione inoltre porta alla perdita del dominio extracellulare e transmembranario di RET, per cui il gene di fusione RET/PTC risulta costituito dal solo dominio catalitico, e non si localizza più a livello della membrana ma nel citoplasma. Inoltre il dominio extracellulare esercitava un controllo negativo sul dominio tirosina-chinasico, che viene perso e pertanto l'oncogene risulta costitutivamente attivo nelle cellule follicolari tiroidee.

Il dominio intracellulare di RET contiene 12 siti di autofosforilazione, dei quali 11 sono presenti anche nell'oncogene RET/PTC (Kodama et al., 2005) (figura 3)

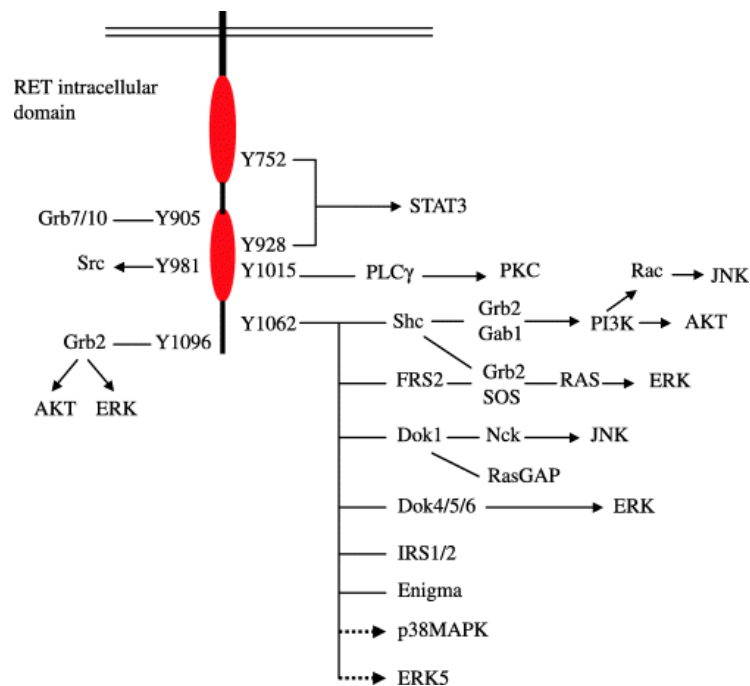


Figura 2 Segnale delle vie mediate da RET/PTC1

Di particolare importanza è la fosforilazione della Tirosina 1062 (Y1062), che rappresenta un sito di legame per diverse proteine come Shc, FRS2, Dok 1/4/5 (downstream of kinase) IRS1/2 (insulin receptor substrate), Enigma. La Y1062 legandosi a Shc recluta rispettivamente i complessi di Grb2-SOS e di Grb2-Gab1, che attivano la via Ras/ERK e PI3K/AKT (fig. 4).

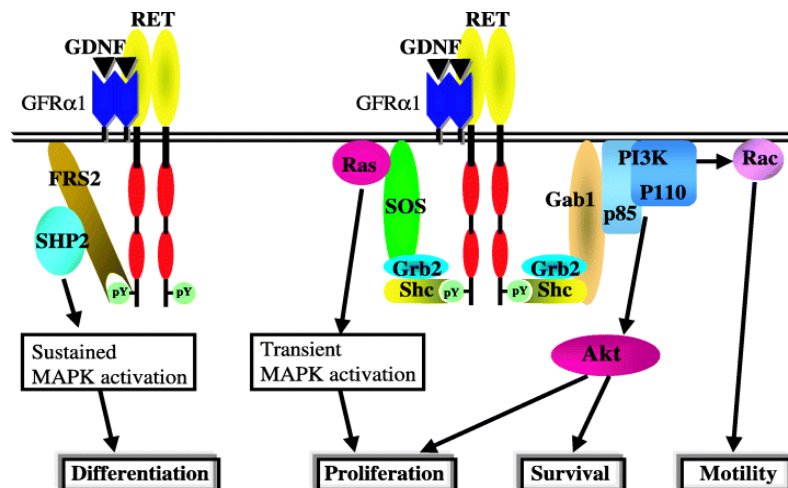


Figura 3 Attivazione delle MAPK

Un ruolo importante è rivestito anche dalla fosforilazione del residuo Y1015, che induce l'attivazione della fosfolipasi C γ (PLC γ). Tale attivazione porta alla formazione di IP $_3$ e DAG:

l'IP3 diffonde nel citoplasma e apre i canali del Ca^{2+} IP3-sensibili localizzati nella membrana del reticolo endoplasmatico, portando al rilascio nel citoplasma del Ca^{2+} immagazzinato. L'aumento del Ca^{2+} citoplasmatico determina una serie di risposte cellulari, tra cui il reclutamento in membrana della proteina chinasi C (PKC), dove essa viene attivata dal DAG. La chinasi attivata, successivamente, fosforila una serie di enzimi cellulari, modulandone l'attività (Kodama et al., 2005).

2 Materiali e metodi

2.1 Colture cellulari, stimolazioni con la fibronectina, vettori e trasfezioni

Uno dei modelli cellulari utilizzati è rappresentato da colture primarie di tiroide umana normale o di carcinomi papilliferi tiroidei. I tessuti tiroidei sono stati ottenuti dalle chirurgie di carcinomi papilliferi della tiroide (PTC) e dai lobi contro laterali di soggetti che sono stati sottoposti a tiroidectomie. E' stato ottenuto il consenso informato per la preparazione di colture cellulari ottenute dai pazienti. I tessuti sono stati tagliati mediante l'ausilio di un bisturi in piccoli pezzi e digeriti con collagene di tipo IV (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO) 1.25 mg/ml, in mezzo F-12 Ham con 0,5% albumina di siero bovino (BSA), e venivano tenuti in agitazione per una notte a 4°C. Le cellule venivano precipitate per centrifugazione a 150 X g per 5', lavate due volte con mezzo F-12 Ham-BSA (F-12/BSA), seminate in piastre di Petri e coltivate a 37°C, in atmosfera 5% di CO₂ in mezzo F12- Ham arricchito con siero fetale bovino (FCS) al 10%. Il mezzo veniva cambiato ogni 3-4 giorni e le cellule venivano raccolte mediante trattamento con 0,05% tripsina, 0,5mM EDTA, in buffer salino fosfato (PBS) privo di Ca²⁺ e Mg²⁺. La linea cellulare TAD-2, ottenuta mediante infezione del virus SV40 di cellule di tiroide fetali umane, sono state donate dal Dr. T. F. Davies (Mount Sinai, New York, NY). Le linee di carcinoma capillifero della tiroide TPC-1 (che esprime l'oncogene RET/PTC) e BCPAP (che esprime l'oncogene BRaf^{V600E}) sono state coltivate in F-12 arricchito con 10% di FCS. Le piastre di fibronectina (FN) sono state preparate nel seguente modo: le piastre sono state riempite con PBS, 1% di BSA denaturata mediante calore (Sigma), o 100 g/ml di FN umana (Collaborative Research, Bedford, MA). Dopo un'incubazione per una notte a 4°C, le piastre venivano lavate per tre volte con PBS e usate. KRas^{V12}, RET/PTC-3, RET/PTC-3^{Y1015F} e RET/PTC-3^{Y1062F} sono stati sottoclonati nel vettore di espressione pcDNA3 e taggati mediante vettore di espressione per myc. Le cellule sono state trasfettate usando la Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

2.2 Western blot e immunoprecipitati

Per l'analisi delle proteine mediante western blot, le cellule venivano lavate 3 volte in PBS, e successivamente lisate in ghiaccio per 30' in RIPA buffer [50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 2 mM EDTA, 2 mM PMSF, 5 ug/mL leupeptina, 5 ug/mL pepstatina]. Il lisato cellulare è stato quantificato mediante il kit Biorad DC protein assay. Un'uguale quantità di estratto proteico è stato caricato in Laemmli buffer [0.125 mol/liter Tris (pH 6.8), 5% glicerolo, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1% β -mercaptoethanol, and 0.006% blu di bromo fenolo]. Le proteine venivano risolte mediante separazione elettroforetica su gel SDS-poliacrilammide al 10% (SDS-PAGE) e trasferite su membrana di nitrocellulosa Immobilon P (Millipore Corporation, Bedford, MA). I siti reattivi aspecifici delle membrane venivano saturati con una soluzione al 5% di nonfat dry milk, 1% ovalbumin, 5% FCS, e 7.5% glycine in PBS, per un'ora in agitazione a temperatura ambiente. Le membrane venivano poi incubate per una notte a 4°C con gli anticorpi primari specifici, lavate in T-PBS (0.1% Tween20) e incubate per un'ora a temperatura ambiente con anticorpi secondari coniugati con la perossidasi di rafano, diluiti 1:3000 in T-PBS (anti-mouse HRP, anti-Rabbit HRP: Biorad). Infine le bande proteiche venivano visualizzate mediante un sistema di chemiluminescenza (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Le immagini acquisite al computer venivano quantificate usando ImageJ 1.39u, National Institutes of Health, U.S.A. Per l'immunoprecipitato, le cellule sono state lisate in buffer di immunoprecipitazione [(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycolate, 0.1% SDS, 10 mM NaF, 5 mM EGTA, 10 mM sodium pyrophosphate, and 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride]. L'anticorpo policlonale di coniglio reattivo verso tutte le isoforme di CaMKII (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) e le beads di protein G plus/protein A agarose (Oncogene Science, Boston, MA) sono state utilizzate per immunoprecipitare CaMKII da 1 mg di lisato totale. L'anticorpo monoclonale verso la forma totale e fosforilata di ERK1/2 sono stati comprati dalla Santa Cruz Biotechnology. L'anticorpo policlonale antiphospho-CaMKII (pT286-CaMKII) è stato comprato Promega (Madison, WI) ed infine l'anticorpo policlonale antiphosphoPKC α dall' UBI.

2.3 Attività di CaMKII, inibitori e virus

Per inibire l'attività di CaMKII sono stati utilizzati due diversi inibitori: KN93 (BIOMOL international) e AntCaNtide. KN93 è un potente inibitore farmacologico, selettivo per tutte le

CaMKs ($IC_{50}=370$ nM). Questo farmaco è un isoquinolonesulfonamide e funziona come un antagonista competitivo per la tasca dell'ATP (Tokumitsu et al., 1990). L'inibitore specifico per CaMKII, Ant-CaNtide, è derivato dalla protein inibitoria endogena di CaMKII, CaMKIIN, (Chang et al., 1998) ed reso cellula- permeante dall'aggiunta all'Nterminale di una sequenza derivate dall' antennepedia (Ant-CaNtide: RQIKIWFQNRRMKWKKR PPKLG QIGRSKRVVIEDDRIDDLVK).

La forma cataliticamente inattiva di CaMKII α , K42M, è stata sottoclonata in pSP72 (Promega). Gli adenovirus ricombinanti, CaMKIIDN (che esprime una forma mutata di CaMKII α dominante negativo) e CaMKII 1-290 (esprime il mutante costitutivamente attivo di CaMKII α) venivano generati mediante il sistema AdEasy, prima descritto da He e colleghi e ora disponibile alla Qbiogene (Draznin et al., 1987a) Per le infezioni delle cellule TPC-1: circa $1,5 \times 10^6$ cellule sono state piastrate in una piastra da 100 mm 24 h prima dell'infezione e incubate a 37°C e 1 ml di mezzo cellulare contenente una quantità di adenovirus pari a 100 particelle virali/cellula (vp/cell). Dopo 30 min di incubazione, sono stati aggiunti alla piastra 6 ml di mezzo di coltura DMEM arricchito con il 10% di FCS. Gli esperimenti sono stati eseguiti 24 ore dopo dall'infezione. Gli adenovirus e i virus di controllo mock, sono stati gentilmente donati dal Dr. A.R. Means (Duke University, Durham, NC).

Gli inibitori della calmodulina (CaM), il trifluoperazine (TFP) e N-(6-123 aminoheptyl)-5-chloro-1-naphthalene-sulfonamide (W7) sono stati comprati dalla Sigma. ZD6474 è stato generosamente donato dalla AstraZeneca (Macclesfield, UK).

Per determinare l'attività di CaMKII, le cellule sono state lisate in RIPA buffer e immunoprecipitate secondo il metodo prima descritto. Nella prima reazione CaMKII immunoprecipitata dal lisato cellulare è stata incubata per 30 min a 30°C con 5 mM $CaCl_2$ e 5 μ M di CaM in 50 μ l di una miscela di reazione contenente 50 mM HEPES pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 0,5 mM dithiothreitol (DTT), 2 μ M CaM, 100 nM microcystin, 0,5 mM ATP freddo. Una aliquota di 10 μ l dalla prima reazione è stata incubata con 25 mM EGTA, 0,5 mM Autocamtide (Hanson et al., 1989) e 50 μ M ATP (1500 cpm/pmol [γ - ^{32}P]ATP) per determinare l'attività autonoma di CaMKII sul suo substrato peptidico Autocamtide. La reazione è stata condotta per 30 min a 30°C e una aliquota di 20 μ l della miscela di reazione è stata spotta su filtri p81 di fosfocellulosa (Upstate Biotechnology, Lake placid, NY). I livelli di incorporazione di [^{32}P] nell' Autocamtide sono stati determinati mediante conta con liquido di scintillazione. La Ionomicina (Sigma) ad una concentrazione di 500 ng/ml è stata usata come controllo positivo dell'attività di CaMKII. La CaM purificata e l' Autocamtide sono stati generosamente donate dal Dr. A.R. Means, (Duke University, Durham, NC).

2.4 Rilevamento di BRaf^{V600E} e del riarrangiamento RET/PTC

La ricerca delle mutazioni per BRaf sono state effettuate sul DNA genomico mediante amplificazione per PCR mutanti allele-specifico, come descritto in letteratura (Sapio et al., 2006). Il rilevamento dei riarrangiamenti RET/PTC è stato effettuato mediante Southern blot sui prodotti di RT-PCR per i domini tirosin chinasi e extracellulari. L'RNA delle cellule TPC-1 e NIH3T3 è stato usato, rispettivamente, come controllo positivo e negativo. L'espressione del dominio tirosin chinasi da solo indicava la presenza dei riarrangiamenti RET/PTC.

2.5 Estrazione di DNA genomico sequenziamento

Allo scopo di determinare se l'isoforma α di CaMKII espressa nelle TPC-1 risultasse costitutivamente attiva perché mutata, ne ho estratto il DNA genomico, ed ho amplificato il gene codificante per CaMKII α . I prodotti amplificati sono stati sequenziati mediante elettroforesi capillare, con rilevamento di fluorescenza laser-eccitata, usando un analizzatore genetico 3100 Avant della ABI.

Per l'estrazione di DNA, le cellule venivano tripsinizzate, risospese, e poi lavate con PBS per 2 volte, centrifugando a 1.300 rpm per 5'. Il pellet veniva infine risospeso in 200 μ l Tail Buffer + 15 μ l Proteinasi K (10mg/ml, Invitrogen), e i campioni venivano incubati a 37°C per tutta la notte.

Il mattino seguente venivano aggiunti 90 μ l NaCl saturo, ed il campione veniva centrifugato per 10' a 13.000 rpm.

A 260 μ l di sovrantante venivano aggiunti 520 μ l di etanolo 100%

Il DNA veniva prelevato con una pipetta pasteur, e lavato prima in etanolo 70% e successivamente in etanolo 100%.

Infine il DNA veniva risospeso in 120 μ l di H₂O sterile.

2.6 Incorporazione di Timidina triziata [³H]

Per determinare la sintesi di DNA, le cellule sono state piastrate in una piastra a 24 pozzetti, private del siero per 12 h in mezzo di coltura DMEM con 0,5% BSA. Alle piastre sono stati quindi aggiunti 0,5 μ Ci di timidina [³H]. Dopo 24 h le cellule sono state delicatamente lavate in PBS 1X, è stato aggiunto acido tricloroacetico (TCA) al 10% e poi incubato per 10 min a 4°C

con TCA al 20%. Le cellule sono state quindi lavate con TCA al 5% e lisate con 0.2% di SDS e 0,5 N di NaOH per 15 min a 4°C. Il lisato cellulare è stato infine risospeso in 5 ml di liquido di scintillazione e l'incorporazione di timidina è stata determinata mediante conte in un β -counter (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

2.7 Analisi statistiche

I risultati sono stati presentati come medie \pm SD. L'analisi statistica è stata effettuata mediante t-test. Il livello di significatività è stato testato ad un valore del *P value* minore di 0,01.

3 Risultati

3.1 CaMKII è costitutivamente attiva nelle cellule di PTC non stimulate

In colture primarie di tiroidi normali è stata determinata la fosforilazione di Erk e CaMKII mediante Western blot. Entrambe le chinasi risultano non fosforilate dopo privazione del siero e 30 min di sospensione (Fig. 5A). L'adesione cellulare alla FN o la stimolazione con il siero induce la fosforilazione sia di Erk che di CaMKII. L'inibizione delle CaMKs con il KN93 inibisce la fosforilazione di Erk indotta dalla FN, e l'inibizione della calmodulina con il W7 e il TFP inibisce sia la fosforilazione di CaMKII che di Erk (Fig 5B). Ho quindi analizzato la fosforilazione di CaMKII in colture primarie di 8 PTCs. CaMKII risulta attivata in cellule starvate e lasciate in sospensione per 30 min, e la stimolazione con la FN non induce un ulteriore aumento della fosforilazione (Fig. 6) Questi risultati indicano che CaMKII è costitutivamente attiva e non è oltremodo modulabile dalle integrine. Le analisi genetiche di 6 degli 8 PTCs, hanno dimostrato la presenza del riarrangiamento RET/PTC in un solo campione e la presenza di BRAF^{V600E} in tre campioni. La fosforilazione di CaMKII in conzioni di presenza o assenza di stimoli è stata poi analizzata in cellule di tiroide normale fetale immortalizzate (TAD-2) e in linee cellulari di PTC che esprimono gli oncogeni RET/PTC-1 (TPC-1) o BRAF^{V600E} (BCPAP) (Fig.7).

Mentre nelle cellule TAD-2 CaMKII non risulta fosforilata in assenza di adesione alla fibronectina, nelle linee cellulari di PTC questa chinasi risulta fosforilata anche in condizioni di assenza di stimoli, e la FN non induce una ulteriore attivazione della chinasi, come osservato nelle colture primarie di PTC.

3.2 L'attivazione di CaMKII è mediata da un segnale costitutivo a monte Ca²⁺ dipendente

Colture primarie che esprimono l'oncogene RET/PTC, cellule TAD-2 e TPC-1 sono state private del siero, raccolte mediante tripsina e lasciate in sospensione per 30 min con e senza inibitore della calmodulina W7 o TFP. Le cellule sono state quindi lisate e mediante western blot è stata determinata la fosforilazione di CaMKII (Fig.8). Il W7 attenua fortemente la fosforilazione di CaMKII in tutte le cellule. L'inibizione dell'attività di CaMKII per effetto del W7 in cellule TPC-1 è stata confermata in un esperimento dose-effetto, sia attraverso analisi per Western blot che saggio di attività chinastica in vitro (Fig.8B, 8C). L'inibizione della CaM per effetto del W7 diminuisce i livelli di fosforilazione in maniera dose-dipendente,

dimostrando l'esistenza di un segnale Ca^{2+} - calmodulina dipendente responsabile per l'attivazione costitutiva di CaMKII.

3.3 L'attivazione di CaMKII è mediata dalle PLC

Le fosfolipasi C (PLC) mobilitano il calcio dai reticoli intracellulari, queste sono delle importanti modulatrici della concentrazione del calcio intracellulare. Per determinare se l'attivazione di CaMKII potesse essere controllata dalle PLC, le cellule TPC-1 sono state trattate con un inibitore delle PLC U7322 ad una concentrazione di $10\mu\text{M}$ da 15 a 120 min (Fig. 9). I livelli di fosforilazione di PKC α sono stati osservati per determinare l'inibizione di PLC. Una modesta inibizione di PKC α e CaMKII è visibile dopo 60 min di trattamento. PKC α è completamente defosforilata dopo 120 min, mentre la fosforilazione di CaMKII e Erk è fortemente ridotta. L'effetto dose-dipendente del U73122 sulla fosforilazione di CaMKII è stato dimostrato dopo 2 h di trattamento (Fig. 9B).

3.4 RET/PTC e Ras^{V12} attivano CaMKII

L'oncogene RET/PTC genera molteplici vie di segnale, incluse Ras/Raf/Mek/Erk e PLC/PKC che a loro volta possono attivare il pathway di PLC-calcio. Quindi ho investigato se questo oncogene fosse responsabile dell'attivazione di CaMKII. Le cellule TPC-1 sono state trattate con l'inibitore della chinasi RET ZD6474 a differenti concentrazioni (Fig. 10A). L'inibizione osservata della fosforilazione di CaMKII, ha suggerito un ruolo di RET/PTC nell'attivazione di CaMKII. Comunque tale inibitore non è specifico per RET dal momento che inibisce anche altre tirosin chinasi. Quindi ho determinato i livelli di attivazione di CaMKII dopo l'espressione di RET/PTC3 e dei suoi mutanti. Nelle cellule TAD- 2, l'attivazione di CaMKII è stimolata dall'espressione di RET/ PTC3. Anche i suoi mutanti Y1015F e Y1062F (incapaci di attivare, rispettivamente, il pathway delle PLC e di Ras) attivano CaMKII anche se in grado minore rispetto al wild type RET/PTC3 (Fig. 10B). Risultati simili sono stati ottenuti anche nelle cellule COS7 (Fig. 10C). RET/PTC3 e i suoi mutanti Y1015F e Y1062F sembrano ugualmente potenti attivatori di CaMKII, anche se la forte espressione dei mutanti potrebbe aver nascosto una minore capacità di stimolare l'attivazione di CaMKII. Il trattamento con la lovastatina (qui usato come inibitore della isoprenilazione di Ras) per 6 h, riduce fortemente l'attivazione di CaMKII indotta dal mutante Y1015F. Questi risultati dimostrano che RET/PTC attiva CaMKII sia attraverso il pathway delle PLC che di Ras.

3.5 CaMKII è necessaria per la fosforilazione di Erk e la proliferazione cellulare

In cellule TPC-1 è stato determinato l'effetto dell'inibizione di CaMKII. I due inibitori, W7 e KN93, attenuano fortemente la fosforilazione di Erk, indicando che le CaMKs partecipano al segnale che porta all'attivazione di Erk (Fig. 11A). Sebbene CaMKII sia la principale CaMK inibita dal KN93, è stato usato un altro inibitore specifico per CaMKII per studiare il ruolo di questa chinasi nella linea cellulare TPC-1. Le cellule sono state private del siero, trattate con il peptide inibitorio specifico antCaNtide, e la fosforilazione di Erk è stata valutata mediante Western blot dopo 30 min di trattamento (Fig. 11B). L'inibitore riduce fortemente la fosforilazione di Erk in una maniera dose-dipendente. In un esperimento parallelo, le cellule TPC-1 sono state indotte ad esprimere un mutante dominante negativo di CaMKII o attivo di CaMKII (Fig. 11C). Entrambi i mutanti sono stati espressi nelle cellule mediante infezione con adenovirus ricombinanti. La fosforilazione di Erk è fortemente ridotta dall'espressione di CaMKIIDN mentre il mutante attivo di CaMKII non inibisce e né stimola la fosforilazione di Erk. Questi risultati indicano che l'attività di CaMKII è necessaria per il segnale endogeno che porta alla fosforilazione di Erk nelle cellule TPC-1.

3.6 CaMKII è necessaria per la sintesi del DNA in cellule TPC-1

Per determinare il ruolo di CaMKII nella sintesi del DNA, ho determinato l'incorporazione di timidina [^3H] in cellule TPC-1 stimulate con 10%FCS o trattate con differenti inibitori (Fig. 11D). Le cellule sono state private del siero e trattate con FCS, l'inibitore delle CaMK, KN93 o di CaMKII antCaNtide, l'inibitore di Mek PD98052 e U0126, o con la lovastatina inibitore di HMG-CoA che inibisce la prenilazione e quindi l'attività di Ras. Mentre l'FCS stimola, tutti gli inibitori riducono l'incorporazione di timidina [^3H] a livelli simili, dimostrando quindi che la sintesi del DNA richiede CaMKII, Mek, e Ras attivi.

3.7 B $\text{Raf}^{\text{V600E}}$ attiva CaMKII attraverso un meccanismo PLC/ Ca^{2+} /calmodulina-dipendente

Culture primarie di PTC che esprimono B $\text{Raf}^{\text{V600E}}$ e cellule BCPAP sono state private del siero e trypsinizzate mediante tripsina e lasciate in sospensione per 30min con e senza inibitore della

calmodulina W7. Le cellule sono state quindi lisate ed è stata determinata la fosforilazione di CaMKII mediante analisi per Western blot (Fig. 12A). Così come avveniva nelle cellule che esprimono RET/PTC, il W7 riduce la fosforilazione di CaMKII in entrambi i modelli cellulari, dimostrando l'esistenza di un segnale Ca^{2+} /calmodulina- dipendente responsabile per l'attivazione costitutiva di CaMKII. In seguito è stata determinata l'attivazione di CaMKII nelle cellule BCPAP trattate con l'inibitore delle PLC U73122 ad una concentrazione di $10\mu\text{M}$ da 60 a 120 min (Fig. 12B). La fosforilazione di CaMKII è fortemente attenuata dopo 120 min di trattamento, dimostrando che il ruolo delle PLC. Per determinare se $\text{Braf}^{\text{V600E}}$ attiva CaMKII, è stata indotta l'espressione di questo oncogene nelle cellule TAD-2 (Fig 12C). La fosforilazione di CaMKII è aumentata dall'espressione di $\text{Braf}^{\text{V600E}}$. Il trattamento delle cellule con U73122 inibisce completamente la fosforilazione di CaMKII, dimostrando che $\text{Braf}^{\text{V600E}}$ attiva CaMKII attraverso le PLC. Per determinare il ruolo di CaMKII sull'attività di Erk nelle cellule che esprimono $\text{Braf}^{\text{V600E}}$, le cellule BCPAP sono state trattate con KN93, W7 o antCaNtide. Nessuno di questi inibitori ha ridotto in maniera significativa la fosforilazione di Erk, indicando che CaMKII è attivata da $\text{Braf}^{\text{V600E}}$ ma non media la successiva attivazione di Erk.

4 Figure e Leggende

Fig.5 La fosforilazione di CaMKII e Erk in colture primarie di cellule della tiroide.

Colture primarie di cellule di tiroide normale sono state private del siero per 12 h, risospese mediante tripsina e lasciate in sospensione per 30 min. A, le cellule sono state piastrate su piastre ricoperte di FN per i tempi indicati o trattate in sospensione con 10% di FCS per 30 min. B, le cellule sono state trattate come prima, dopo un pretrattamento di 30 min con $30\mu\text{M}$ di KN93, $1\mu\text{M}$ di TFP o $15\mu\text{M}$ di W7. La fosforilazione di Erk e CaMKII è stata determinata mediante Western blot. Le medie e le SD delle relative espressioni delle chinasi fosforilate, sono state determinate per densitometria scanner di tre esperimenti indipendenti. In A e in B, tutti i punti sperimentali sono significativi verso i punti non stimolati

Fig. 6 CaMKII è attivata nei PTC di colture primarie.

Colture primarie di 8 PTC (6 degli 8 analizzati sono stati riportati) e linee cellulari sono state private del siero per 12 h, risospese, lasciate in sospensione o piastrate su piastre di FN per 30 min e analizzate per Western blot per la forma totale e fosforilata di CaMKII. Le medie e le SD

delle relative espressioni di CaMKII fosforilata, sono state determinate per densitometria scanner di esperimenti indipendenti (PTC, N= 8). Un valore di 1 O.D unità arbitrarie è stato assegnato ai campioni non stimolati.

Fig.7 CaMKII è attivata nelle linee cellulari PTC

Culture primarie di cellule di tiroide normale (NT) e linee cellulari TAD-2, TPC-1 e BCPAP, sono state private del siero, lasciate in sospensione o piastrate su piastre di FN per 30 min. La fosforilazione di CaMKII è stata determinata per Western blot. Le medie e le SD delle relative espressioni di CaMKII fosforilata, sono state determinate per densitometria scanner. Un valore di 1 O.D unità arbitrarie è stato assegnato ai campioni non stimolati.

Fig. 8 Un segnale Ca^{2+} -dipendente media l'attivazione costitutiva di CaMKII nei PTC che esprimono RET/PTC

Culture primarie di PTC che esprimono RET/PTC (PTC), e linee cellulari TAD-2 e TPC-1 sono state private del siero, lasciate in sospensione o piastrate su piastre di FN per 30 min, o trattate per 30 min con l'inibitore della calmodulina W7. La fosforilazione di CaMKII è stata determinata per Western blot. Le medie e le SD delle relative espressioni di CaMKII fosforilata, sono state determinate per densitometria scanner. Un valore di 1 O.D unità arbitrarie è stato assegnato ai campioni trattati con W7. Nelle cellule TPC-1 l'effetto dose-dipendente del W7 è stato determinate per fosforilazione di CaMKII (B) e attività enzimatica (C) attraverso Western blot o saggio di attività chinasi in vitro.

Fig 9 PLC media l'attivazione di CamKII

A, cellule TPC-1 sono state trattate con 10 μ M di U73122 da 15 a 120 min. I lisati cellulari sono stati analizzati per Western blot con anticorpi diretti contro le forme fosforilate di CaMKII e PKC α . B, le cellule sono state trattate per 2 h con le concentrazioni indicate di U73122. Le medie e le SD delle relative espressioni di pCaMKII e pErk, sono state determinate per densitometria scanner.

Fig. 10 RET/PTC e Ras^{V12} attivano CaMKII

A, cellule TPC-1 sono state trattate per 24 h con ZD6474 alle concentrazioni indicate, e pCaMKII è stata determinata per Western blot. Cellule TAD-2 (B) e COS7 (C) sono state trasfettate con 5 μ g/piastra di vettore di espressione taggato con myc per Ras^{V12}, RET/PTC-3, RET/PTC-3^{Y1051F} (Y1015) o 2,5 μ g/piastra di RET/PTC-3^{Y1062F} (Y1062). Quest'ultimo risultava

tossico per le cellule a concentrazioni più elevate. Dopo 48 h le cellule venivano lisate e pCaMKII e myc venivano determinate per Western blot.

Fig 11 CaMKII è necessaria per la fosforilazione di Erk

Cellule TPC-1 sono state private del siero e trattate per 30 min in sospensione con l'inibitore delle CaMK KN93 o W7 (A), o il peptide inibitorio specifico per CaMKII antCaNtide (B). La fosforilazione di Erk è stata valutata mediante Western blot. C, le cellule sono state infettate con adenovirus ricombinanti che esprimono un vettore vuoto, o il mutante dominante negativo di CaMKII (CaMKIIDN) o il mutante attivo (CaMKIIact). L'espressione delle proteine ricombinanti è stata valutata mediante Western blot con anticorpo per CaMKII.

Cellule TPC-1 sono state piastrate in piastre da 24 pozzetti, private del siero per 12 h e pretrattate per 30 min con FCS (10%), antCaNtide (5µM), KN93 (10µM), PD98052 (50µM), U0126 (30µM) o per 6 h con lovastatina (30µM). Infine, nello stesso mezzo sono stati aggiunti 10 µl di timidina [³H]. Dopo 24 h, le piastre sono state lavate e la radioattività insolubile dal TCA è stata contata mediante liquido di scintillazione in un β-counter. In un esperimento parallelo il ciclo cellulare è stato analizzato per citometria a flusso usando lo ioduro propidio.

Fig. 12 Braf^{V600E} attiva CaMKII attraverso il segnale PLC/Ca²⁺-dipendente

A, colture primarie di PTC che esprimono Braf^{V600E} (PTC) e cellule BCPAP sono state private del siero, lasciate in sospensione con o senza W7 30µM ed è stata determinata la fosforilazione di CaMKII per Western blot. B, cellule BCPAP sono state trattate per 60 o 120 min con U73122 10µM. L'assenza della fosforilazione di PKCα indica che PLC è stata inibita. C, cellule TAD-2 sono state trasfettate con 5µg/piastra di vettore di espressione taggato con myc per RET/PTC-3, o 10µg/piastra di Braf^{V600E}. Dopo 48 h, le cellule sono state lisate e pCaMKII è stata determinata per Western blot. D, cellule BCPAP sono state private del siero e trattate in sospensione con KN93, W7 o antCaNtide alle concentrazioni indicate per 30 min, e la fosforilazione di Erk è stata determinata per Western blot.

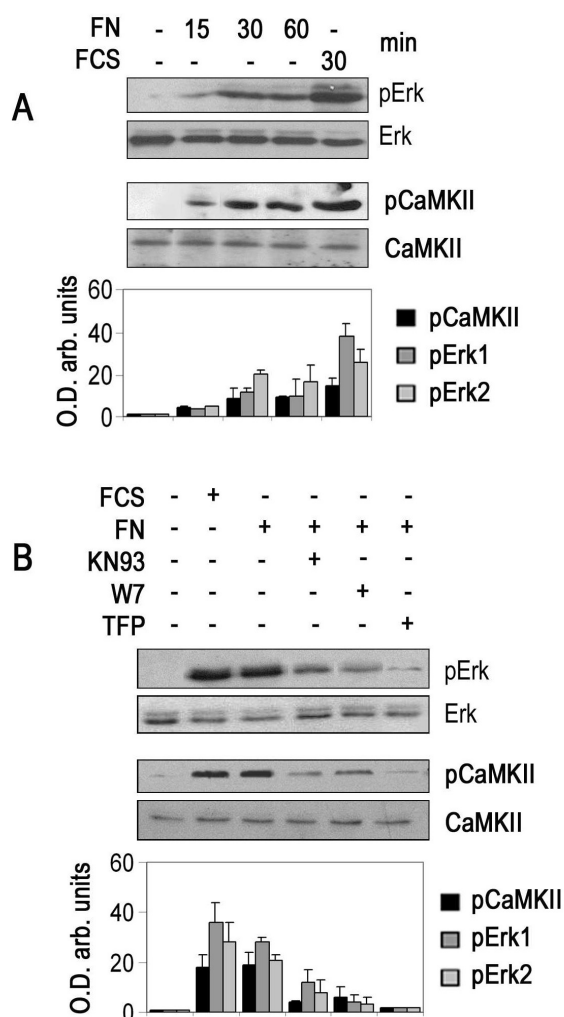


Figura 4 La fosforilazione di CaMKII e Erk in colture primarie di cellule della tiroide.

Colture primarie di cellule di tiroide normale sono state private del siero per 12 h, risospese mediante tripsina e lasciate in sospensione per 30 min. A, le cellule sono state piastrate su piastre ricoperte di FN per i tempi indicati o trattate in sospensione con 10% di FCS per 30 min. B, le cellule sono state trattate come prima, dopo un pretrattamento di 30 min con 30 μ M di KN93, 1 μ M di TFP o 15 μ M di W7. La fosforilazione di Erk e CaMKII è stata determinata mediante Western blot. Le medie e le SD delle relative espressioni delle chinasi fosforilate, sono state determinate per densitometria scanner di tre esperimenti indipendenti. In A e in B, tutti i punti sperimentali sono significativi verso i punti non stimolati

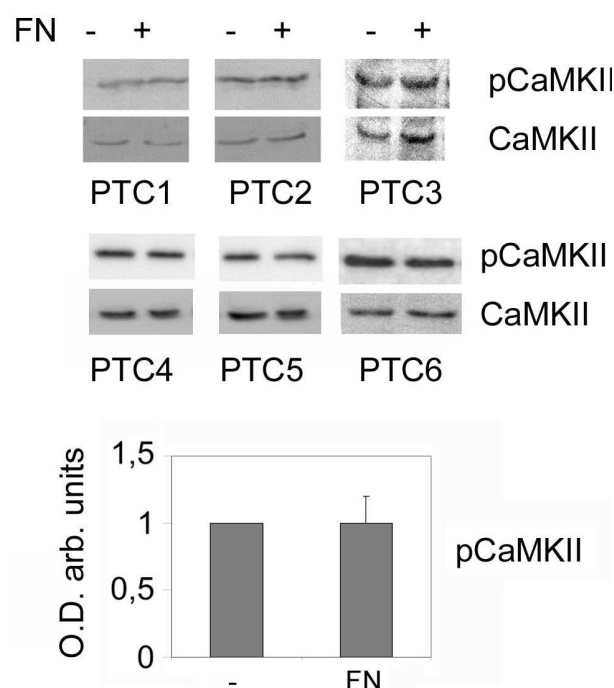


Figura 5 CaMKII è attivata nei PTC di colture primarie.

Culture primarie di 8 PTC (6 degli 8 analizzati sono stati riportati) e linee cellulari sono state private del siero per 12 h, risospese, lasciate in sospensione o piastrate su piastre di FN per 30 min e analizzate per Western blot per la forma totale e fosforilata di CaMKII. Le medie e le SD delle relative espressioni di CaMKII fosforilata, sono state determinate per densitometria scanner di esperimenti indipendenti (PTC, N= 8). Un valore di 1 O.D unità arbitrarie è stato assegnato ai campioni non stimolati.

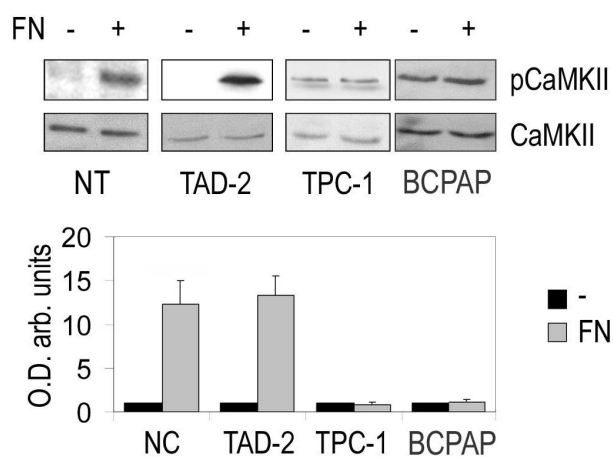


Figura 6 CaMKII è attivata nelle linee cellulari PTC

Culture primarie di cellule di tiroide normale (NT) e linee cellulari TAD-2, TPC-1 e BCPAP, sono state private del siero, lasciate in sospensione o piastrate su piastre di FN per 30 min. La fosforilazione di CaMKII è stata determinata per Western blot. Le medie e le SD delle relative espressioni di CaMKII fosforilata, sono state determinate per densitometria scanner. Un valore di 1 O.D unità arbitrarie è stato assegnato ai campioni non stimolati.

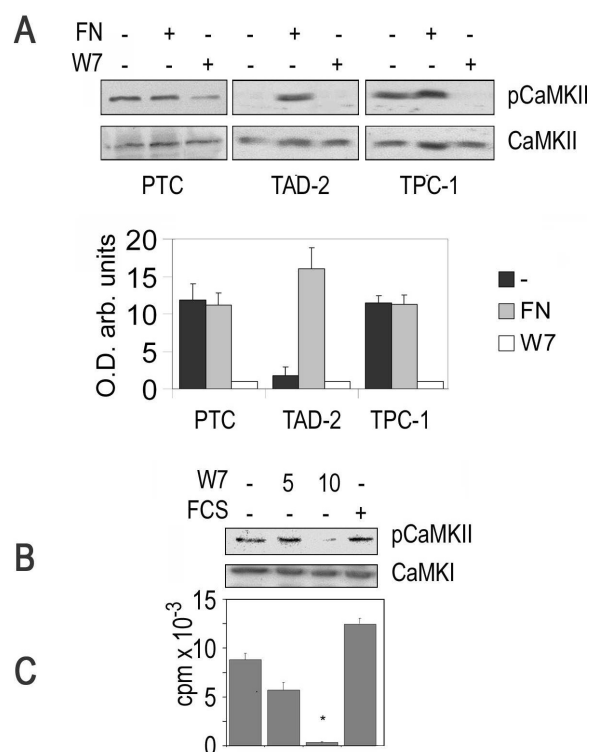


Figura 8 Un segnale Ca^{2+} -dipendente media l'attivazione costitutiva di CaMKII nei PTC che esprimono RET/PTC

Colture primarie di PTC che esprimono RET/PTC (PTC), e linee cellulari TAD-2 e TPC-1 sono state private del siero, lasciate in sospensione o piastrate su piastre di FN per 30 min, o trattate per 30 min con l'inibitore della calmodulina W7. La fosforilazione di CaMKII è stata determinata per Western blot. Le medie e le SD delle relative espressioni di CaMKII fosforilata, sono state determinate per densitometria scanner. Un valore di 1 O.D unità arbitrarie è stato assegnato ai campioni trattati con W7. Nelle cellule TPC-1 l'effetto dose-dipendente del W7 è stato determinato per fosforilazione di CaMKII (B) e attività enzimatica (C) attraverso Western blot o saggio di attività chinasi in vitro.

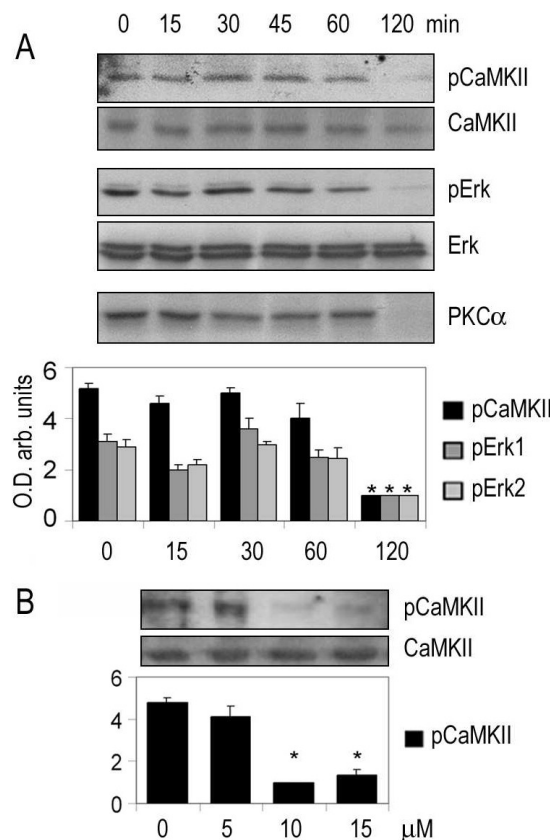


Figura 9 PLC media l'attivazione di CamKII

A, cellule TPC-1 sono state trattate con 10μM di U73122 da 15 a 120 min. I lisati cellulari sono stati analizzati per Western blot con anticorpi diretti contro le forme fosforilate di CaMKII e PKCα. B, le cellule sono state trattate per 2 h con le concentrazioni indicate di U73122. Le medie e le SD delle relative espressioni di pCaMKII e pErk, sono state determinate per densitometria scanner

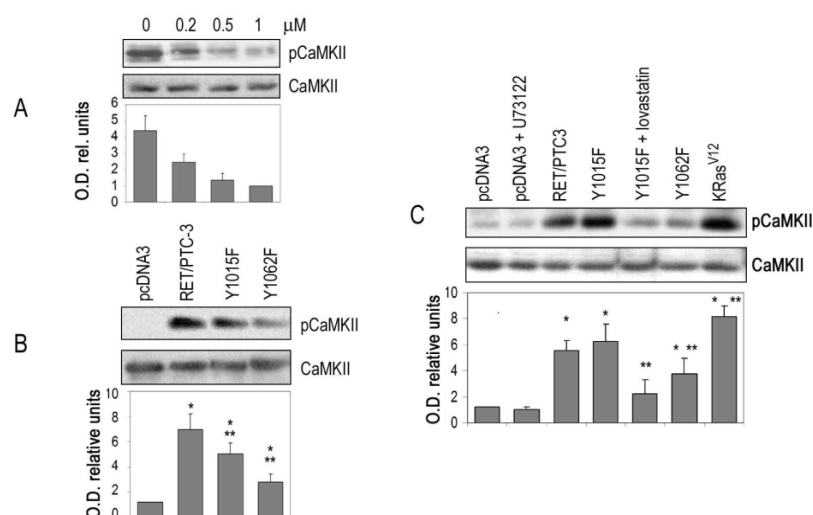


Figura 10 RET/PTC e Ras^{V12} attivano CaMKII

A, cellule TPC-1 sono state trattate per 24 h con ZD6474 alle concentrazioni indicate, e pCaMKII è stata determinata per Western blot. Cellule TAD-2 (B) e COS7 (C) sono state trasfettate con 5μg/piastra di vettore di espressione taggato con myc per Ras^{V12}, RET/PTC-3, RET/PTC-3^{Y1015F} (Y1015) o 2,5μg/piastra di RET/PTC-3^{Y1062F} (Y1062). Quest'ultimo risultava tossico per le cellule a concentrazioni più elevate. Dopo 48 h le cellule venivano lisate e pCaMKII e myc venivano determinate per Western blot

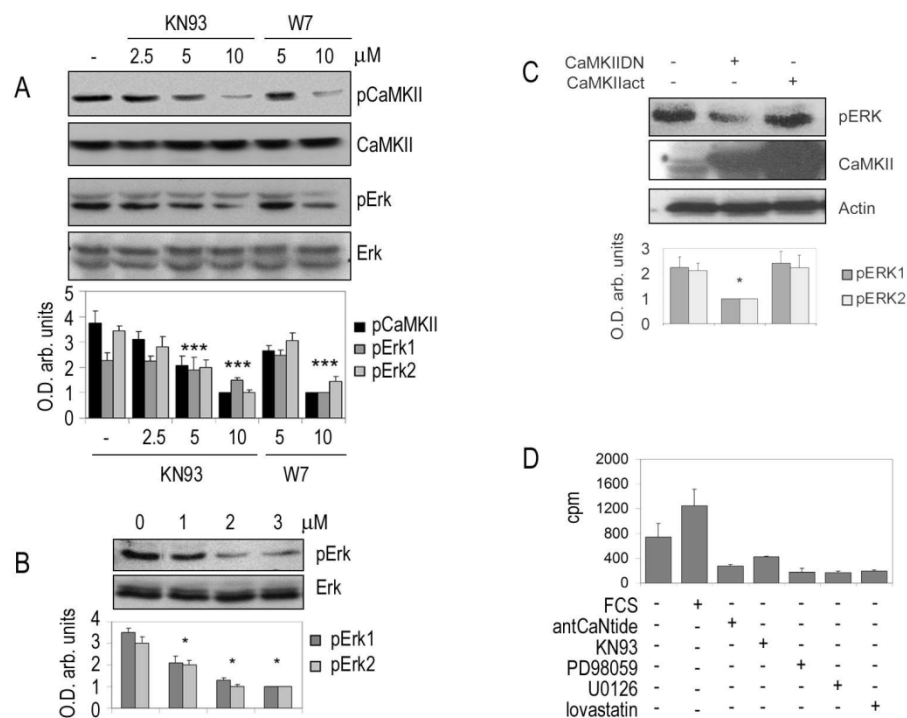


Figura 11 CaMKII è necessaria per la fosforilazione di Erk

Cellule TPC-1 sono state private del siero e trattate per 30 min in sospensione con l'inibitore delle CaMK KN93 o W7 (A), o il peptide inibitorio specifico per CaMKII antCaNtide (B). La fosforilazione di Erk è stata valutata mediante Western blot. C, le cellule sono state infettate con adenovirus ricombinanti che esprimono un vettore vuoto, o il mutante dominante negativo di CaMKII (CaMKIIDN) o il mutante attivo (CaMKIIact). L'espressione delle proteine ricombinanti è stata valutata mediante Western blot con anticorpo per CaMKII.

Cellule TPC-1 sono state piastrate in piastre da 24 pozzetti, private del siero per 12 h e pretrattate per 30 min con FCS (10%), antCaNtide (5μM), KN93 (10μM), PD98052 (50μM), U0126 (30μM) o per 6 h con lovastatina (30μM). Infine, nello stesso mezzo sono stati aggiunti 10 μl di timidina [³H]. Dopo 24 h, le piastre sono state lavate e la radioattività insolubile dal TCA è stata contata mediante liquido di scintillazione in un β-counter. In un esperimento parallelo il ciclo cellulare è stato analizzato per citometria a flusso usando lo ioduro propidio.

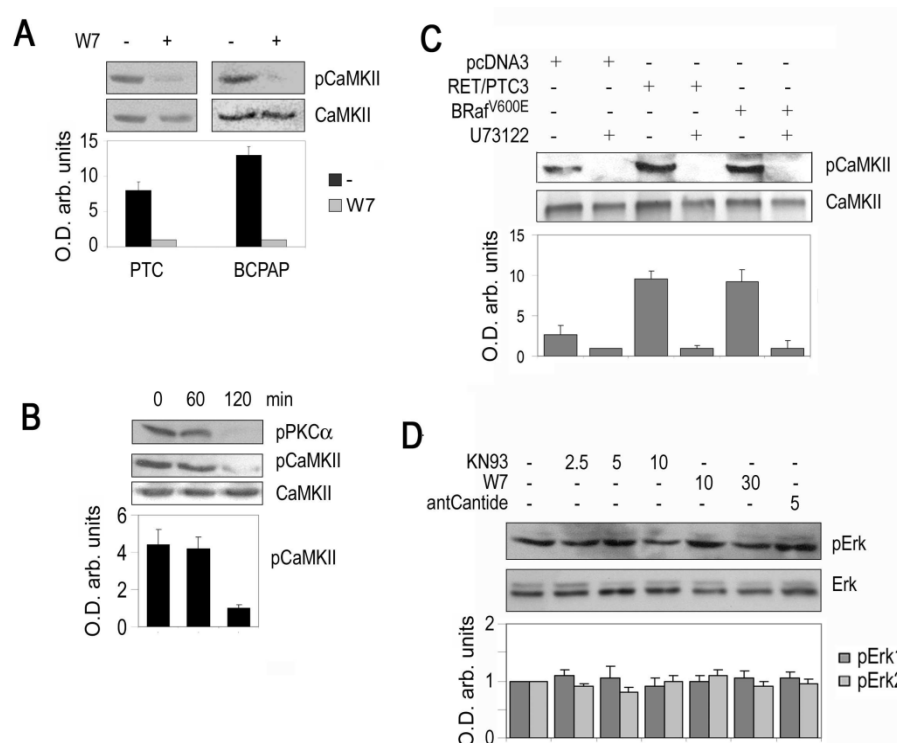


Figura 12 BRaf^{V600E} attiva CaMKII attraverso il segnale PLC/Ca²⁺-dipendente

A, colture primarie di PTC che esprimono Brf^{V600E} (PTC) e cellule BCPAP sono state private del siero, lasciate in sospensione con o senza W7 30μM ed è stata determinata la fosforilazione di CaMKII per Western blot. B, cellule BCPAP sono state trattate per 60 o 120 min con U73122 10μM. L'assenza della fosforilazione di PKCα indica che PLC è stata inibita. C, cellule TAD-2 sono state trasfettate con 5μg/piastra di vettore di espressione taggato con myc per RET/PTC-3, o 10μg/piastra di BRaf^{V600E}. Dopo 48 h, le cellule sono state lisate e pCaMKII è stata determinata per Western blot. D, cellule BCPAP sono state private del siero e trattate in sospensione con KN93, W7 o antCaNtide alle concentrazioni indicate per 30 min, e la fosforilazione di Erk è stata determinata per Western blot.

5 Discussione

CaMKII è un enzima multimerico composto da 10-12 subunità catalitiche. L'attivazione di una singola sub unità catalitica richiede il suo legame al complesso Ca^{2+} /calmodulina. Questa interazione permette al dominio catalitico di una sub unità di fosforilare il residuo alla Thr286 della sub unità adiacente. Una volta che una sub unità diventa fosforilata, la sua attività chinasi diviene indipendente dal legame Ca^{2+} /calmodulina. Ne consegue che il livello di attivazione di CaMKII nelle cellule dipende dalla concentrazione di Ca^{2+} citoplasmatico. CaMKII gioca un ruolo essenziale nella modulazione dell'attivazione di Erk in diversi modelli cellulari.

Per determinare se il pathway CaMKII/Erk è un meccanismo generale nel controllo della proliferazione cellulare, ho studiato l'interazione tra la via di segnale Ca^{2+} /CaMKII e la via di segnale Ras/Erk in carcinomi papilliferi della tiroide. CaMKII non è attivata nelle cellule di tiroide normale in seguito a privazione di siero e assenza di stimoli, ed è attivata dal siero e dalla FN. Nelle colture primarie di 8 PTC, CaMKII risultava attiva anche in assenza di stimoli, e la FN non era in grado di aumentare ulteriormente la sua attività. L'osservazione di questo aspetto molecolare comune in tutti i PTC analizzati è di notevole importanza, dal momento che i carcinomi papilliferi della tiroide rappresentano un gruppo di tumori con una vasta eterogeneità genetica e differenti alterazioni molecolari. Sebbene l'attivazione finale di Erk sia un evento molecolare comune della tumori genesi delle cellule tiroidee, nei PTC sono state descritte differenti alterazioni genetiche. In aggiunta i riarrangiamenti RET/PTC e TRK-T e le mutazioni di Ras e BRAF portano tutte alla trasformazione maligna delle cellule tiroidee attraverso il pathway delle MAPK, una cascata chinasi di segnali mitogenici che regola la proliferazione cellulare e il differenziamento. L'inibizione dell'attivazione di CaMKII attraverso gli inibitori della calmodulina, dimostra che questa chinasi sostiene il meccanismo regolatorio fisiologico Ca^{2+} -dipendente in questi tumori. Fino ad oggi, non sono state descritte mutazioni di questa chinasi e solo la forma troncata di CaMKII genera una chinasi costitutivamente attiva che non è dipendente dalla presenza del complesso Ca^{2+} /calmodulina (Means, 2000). Il Ca^{2+} ha un impatto molto importante nella vita della cellula in molti altri fattori che concorrono nella sua concentrazione intracellulare finale (Clapham, 2007). I livelli di Ca^{2+} citoplasmatico sono mantenuti più bassi del compartimento extracellulare attraverso continue estrusioni mediante i trasportatori Ca^{2+} /ATPase della membrana plasmatica (PMCA) e del reticolo endoplasmatico liscio (SERCA), e attraverso lo scambiatore Na/Ca^{2+} (NCX). Un meccanismo per il segnale del calcio è il rilascio dal reticolo endoplasmatico in risposta

all'attivazione di alcuni recettori. I recettori tirosin chinasi possono modulare i livelli di Ca^{2+} attivando le PLC che a sua volta può liberare inositolo (1,4,5) trifosfato (IP3) dall'inositolo 4,5 bifosfato. IP3 è un ligando del recettore dell'IP3 dei canali cationici che sono diffusi nella membrana del reticolo endoplasmatico. La loro attivazione induce il rilascio di Ca^{2+} dal reticolo endoplasmatico verso il citoplasma. Inoltre, le PLC, attraverso l'IP3 è un importante fattore che porta alla modulazione del segnale Ca^{2+} /CaMKII. I risultati di questo lavoro indicano che il segnale costitutivamente attivo Ca^{2+} /CaMKII nelle linee cellulari PTC è mediato dalle PLC. Come osservato nelle colture primarie di PTC, così anche nella linea cellulare TPC-1 CaMKII è attivata in asseza di siero e stimolazione con la fibronectina. E' stata scelta la linea cellulare TPC-1 poichè rappresenta un modello certo e valido di linea cellulare di carcinoma capillifero della tiroide che esprime l'oncogene RET/PTC (Schweppe et al., 2008). I riarrangiamenti RET/PTC sono un gruppo di tirosin chinasi citoplasmatiche che attivano differenti segnali (Ciampi and Nikiforov, 2007; Kimura et al., 2003; Knauf et al., 2003; Melillo et al., 2005). Il dominio tirosin chinasi di RET contiene molti residui tirosinici che possono essere fosforilati, partecipando agli effetti biologici di questo oncogene. Tra queste fosfotirosine, le tirosine 1015 e 1062 giocano un ruolo molto importante nel segnale di RET/PTC. Le tirosine fosforilate 1015 e 1062 sono siti di interazione per PLC γ e Shc rispettivamente (Arighi et al., 1997; Borrello et al., 1996; Salvatore et al., 2000). Ne consegue che RET/PTC può modulare la concentrazione intracellulare di Ca^{2+} attraverso Y1015/PLC γ che attiva a sua volta CaMKII. Anche la Y1062 può partecipare al segnale Ca^{2+} /CaMKII essendo un sito di interazione di Shc che associa RET/PTC Ras. Ha-Ras attivato lega e stimola PLC ϵ , l'ultimo membro identificato della famiglia delle PLC (Kelley et al., 2001). Quindi, oltre a RET/PTC, anche Ras oncogenico rappresenta un possibile iniziatore del segnale PLC/ Ca^{2+} /calmodulina/CaMKII. Come atteso, l'espressione di RET/PTC-3 in due differenti linee cellulari era capace di stimolare fortemente la fosforilazione di CaMKII (Fig. 6). Inoltre entrambi i pathway Y1062/Ras e Y1015/PLC sembrano contribuire all'attivazione di CaMKII, dimostrando che RET/PTC attiva CaMKII attraverso entrambi i pathways. L'analisi degli 8 PTC, inclusi quelli che esprimono Braf^{V600E}, hanno dimostrato che l'attivazione costitutiva di CaMKII nei PTC non è ristretta solo a quelli che esprimono RET/PTC ma possono esistere anche altri pathways attivanti. RET/PTC, Braf^{V600E} e Ras oncogenico attivano un programma trascrizionale comune nelle cellule tiroidee che include un'a up-regolazione delle chemochine CXCL1 e CXCL10 e del recettore delle chemochine CXCR4 (Castellone et al., 2004; Melillo et al., 2005) Le risposte cellulari a queste chemochine sono iniziate da uno specifico recettore cellulare di superficie della famiglia dei recettori accoppiati alle proteine-G (Richardson et al.,

1998; Zlotnik and Yoshie 2000). I recettori accoppiati alle proteine G (soprattutto il sottotipo Gq/11), generano IP3 attivando PLC β e, come i recettori tirosin chinasi, modulano la concentrazione citoplasmatica di Ca²⁺. Quindi RET/PTC, Braf^{V600E} e Ras oncogenico può modulare il segnale del Ca²⁺ attraverso molteplici meccanismi che può spiegare l'attività basale di CaMKII osservata in tutti i PTC analizzati, inclusi quelli che non esprimono RET/PTC. L'inibizione di CaMKII ottenuta attraverso antCaNtide e CaMKIIDN, hanno dimostrato che questa chinasi partecipa all'attivazione basale di Erk nelle cellule TPC-1. E' stato precedentemente dimostrato che CaMKII è necessaria per l'attivazione di Raf-1 attraverso le integrine in cellule umane di tiroide e attraverso l'insulina in fibroblasti umani (Illario et al., 2005a; Illario et al., 2005b; Monaco et al., 2009). Quindi Raf-1 potrebbe essere uno dei possibili componenti del pathway di Erk che richiede CaMKII attiva nelle cellule TPC-1. Fino ad oggi, il ruolo di CaMKII nella modulazione dell'attività di Braf non è stato ancora studiato. Nelle cellule BCPAP, l'inibizione di CaMKII non produce alcun effetto significativo sull'attivazione di Erk. Questa osservazione può essere spiegata dalla presenza in questa linea cellulare di Braf^{V600E}, che è costitutivamente attivata. Comunque, questo non esclude un ruolo per CaMKII nei tumori che esprimono Braf^{V600E}, dal momento che è coinvolta in importanti funzioni cellulari come la motilità cellulare, una funzione cellulare promossa anche da Braf^{V600E}, attraverso le chemochine e PLC, e la via non-canonica del segnale di Wnt che modula il destino della cellula durante il differenziamento e la trasformazione (Kremenevskaja et al., 2005; Melillo et al., 2005; Takada et al., 2007).

In conclusione, in tale lavoro è stato dimostrato che CaMKII è attivata nei PTC da RET/PTC, Ras oncogenico e Braf^{V600E} (Rusciano et al, in publishing). Tali risultati suggeriscono che il pathway PLC/CaMKII può rappresentare un appropriato target per gli interventi terapeutici dei tumori che esprimono RET/PTC. Essi suggeriscono inoltre che potrebbe essere studiato il ruolo di CaMKII nei carcinoma midollari della tiroide.

Bibliografia

- Akslen LA, Hanldorsen T, Thoresen SO & Glatte E, 1993. Incidence pattern of thyroid cancer in Norway: influence of birth color and time period. *Int J Canc* **53**, 183-187
- An, P, Zhu, JY, Yang, Y, LV, P, Tian, YH, Chen, M.K, and Luo, HS, 2007. KN-93, a specific inhibitor of CaMKII inhibits human hepatic stellate cell proliferation in vitro. *World J Gastroenterol* **13**, 1445-1448
- Anderson, KA, and Kane, CD, 1998. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV and calcium signaling. *Biometals* **11**, 331-343
- Arighi E, Alberti L, Torriti F, Ghizzoni S, Rizzetti MG, Pelicci G, Pasini B, Bongarzone I, Piutti C, Pierotti MA, and Borrello MG, 1997. Identification of Shc docking site on Ret tyrosine kinase. *Oncogene* **14**, 773-782
- Berridge MJ, 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**, 315-325
- Bito H, 1998. The role of calcium in activity-dependent neuronal gene regulation. *Cell calcium* **23**, 143-150
- Borrello MG, Alberti L, Arighi E, Bongarzone I, Battistini C, Bardelli A, Pasini B, Piutti C, Rizzetti MG, Mondellini P, 1996. The full oncogenic activity of Ret/ptc2 depends on tyrosine 539, a docking site for phospholipase Cgamma. *Mol Cell Biol* **16**, 2151-2163
- Braun AP, and Schulman H, 1995. The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol* **57**, 417-445
- Braverman LE and Utiger DL, 2000. In, Werner and Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text. 8th edn. Lippincott, Williams & Wilkins: Philadelphia, USA
- Brocke L, Srinivasan M, and Schulman H, 1995. Developmental and regional expression of multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase isoforms in rat brain. *J Neurosci* **15**, 6797-6808
- Castellone MD, Guarino V, De Falco V, Carlomagno F, Basolo F, Faviana P, Kruhoffer M, Orntoft T, Russell JP, Rothstein JL, 2004. Functional expression of the CXCR4 chemokine

receptor is induced by RET/PTC oncogenes and is a common event in human papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* **23**, 5958-5967

Chatila T, Anderson KA, Ho N, and Means AR, 1996. A unique phosphorylation-dependent mechanism for the activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type IV/GR. *J Biol Chem* **271**, 21542-21548

Chang BH, Mukherji S, and Soderling TR, 1998. Characterization of a calmodulin kinase II inhibitor protein in brain. *Proc Natl Acad Sci* **95**, 10890-10895

Ciampi R and Nikiforov YE, 2007. RET/PTC rearrangements and BRAF mutations in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology* **148** 936-941;

Clapham DE, 2007. Calcium signaling. *Cell* **131**, 1047-1058

Cohen Y, Xing M, Mambo E, Guo Z, Wu G, Trink B, Beller U, Westra WH, Ladenson PW, Sidransky D, 2003. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **95**, 625-627

Colonna M, Grosclaude P, Remontet L, Schvartz C, Macelesech J, Velten M, Guizard A, Tratarre B, Buemi AV, Arveux P, 2002. Incidence of thyroid cancer in adults recorded by French cancer registries. *European Journal of Cancer* **38**, 1762-1768

Cox AD and Der CJ, 2003. The dark side of Ras: regulation of apoptosis. *Oncogene* **22**, 8999-9006,

Cruzalegui FH, Kapiloff MS, Morfin JP, Kemp BE, Rosenfeld MG, and Means AR, 1992. Regulation of intracellular inhibition of the multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci* **89**, 12127-12131

Cruzalegui FH, and Bading H, 2000. Calcium-regulated protein kinase cascades and their transcription factor targets. *Cell Mol Life Sci* **57**, 402-410

De Cesare D, Fimia GM, and Sassone-Corsi P, 1999. Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation. *Trends in biochem sciences* **24**, 281-285

Demidenko ZN and Blagosklonny MV, 2008 . Growth stimulation leads to cellular senescence when the cell cycle is blocked. *Cell Cycle* **7**, 3355-3361

De Koninck P, and Schulman H, 1998. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations. *Science* **279**, 227-230

Draznin B, Kao M, and Sussman,KE, 1987a. Insulin and glyburide increase cytosolic free-Ca²⁺ concentration in isolated rat adipocytes. *Diabetes* **36**, 174-178

Elisei R, Pinchera A Romei C, Gryczynska M, Pohl V, Maenhaut C, Fugazzola L & Pacini F 1994. Expression of thyrotropin receptor (TSH-R), thyroglobulin, thyroperoxidase, and calcitonin messenger ribonucleic acids in thyroid carcinomas: evidence of TSH-R gene transcript in medullary hystotype. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 867- 871

Esapa CT, Johnson SJ, Kendall-Taylor P, Lennard TW, Harris PE, 1999. Prevalence of Ras mutations in thyroid neoplasia. *Clin Endocrinol* **50**,529–535

Farahati J, Geling M, Mader U, Mortl M, Luster M, Muller JG, Flentje M & Reiners C, 2004. Changing trends of incidence and prognosis of thyroid carcinoma in lower Franconia, Germany, from 1981- 1995. *Thyroid* **14**, 141-147

Frattini M, Ferrario C, Bressan P, Balestra D, De Cecco L, Mondellini P, Bongarzone I, Collini P, Gariboldi M, Pilotti S, Pierotti MA, Greco A, 2004. Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. *Oncogene* **23**,7436–7440

Giese KP, Fedorov NB, Filipkowski RK, and Silva AJ, 1998. Autophosphorylation at Thr286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science* **279**, 870-873

Gomez Segovia I, Gallowitsch HJ, Kresnik E, Kumnig G, Igerc I, Matschnig S, Stronegger WJ and Lind P, 2004. Descriptive epidemiology of thyroid carcinoma in Carinthia, Austria: 184-2001. Histopathologic features and tumor classification of 734 cases under elevated general iodination of table salt since 1990: population-based age- stratified analysis on thyroid carcinoma incidence. *Thyroid* **14**, 277-286

Greco A, Pierotti MA, Bongarzone I, Pagliardini S, Lanzi C, Della Porta G, 1992. TRK-T1 is a novel oncogene formed by the fusion of TPR and TRK genes in human papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* **7**,237–242

Griffith LC, Lu CS, and Sun XX, 2003. CaMKII, an enzyme on the move: regulation of temporospatial localization. *Mol Interv* **3**, 386-403

Hanson PI, Kapiloff MS, Lou LL, Rosenfeld MG, and Schulman H, 1989. Expression of a multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase and mutational analysis of its autoregulation. *Neuron* **3**, 59-70

Haugen BR, 1999. Management of the patient with progressive radioiodine non responsive disease. Seminars in Surgical. *Oncology* **16**, 34-41

Heist EK, and Schulman H, 1998. The role of Ca²⁺/calmodulindependent protein kinases within the nucleus. *Cell calcium* **23**, 103-114

Heist EK, Srinivasan M, and Schulman H, 1998. Phosphorylation at the nuclear localization signal of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II blocks its nuclear targeting. *J Biol Chem* **273**, 19763-19771

Hook S, 2001. Ca²⁺/CaM-DEPENDENT KINASES: From Activation to Function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 471

House SJ, Ginnan RG, Armstrong SE, and Singer HA, 2007. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-delta isoform regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C2276-2287

Howe HL, Wingo Pa, Thun MJ, Ries LA, Rosenberg HM, Feigal EG and Edwards BK, 2001. Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasding trends. *J Natl Cancer Inst* **93**, 824-842

Hudmon A, and Schulman H, 2002. Neuronal CA²⁺/calmodulin dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu Rev Biochem* **71**, 473-510

Illario M, Cavallo AL, Bayer KU, Di Matola T, Fenzi G, Rossi G, and Vitale M, 2003. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II binds to Raf-1 and modulates integrin-stimulated ERK activation. *J Biol Chem* **278**, 45101-45108.

Illario M, Cavallo AL, Monaco S, Di Vito E, Mueller F, Marzano LA, Troncone G, Fenzi G, Rossi G, and Vitale M, 2005a. Fibronectin-Induced Proliferation in Thyroid Cells Is Mediated by $\alpha_3\beta_1$ Integrin through Ras/Raf-1/MEK/ERK and Calcium/CaMKII Signals. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 2865-2873.

Illario M, Cavallo AL, Monaco S, Di Vito E, Mueller F, Marzano LA, Troncone G, Fenzi G, Rossi G, and Vitale M, 2005b. Fibronectin induced proliferation in thyroid cells is mediated by $\alpha_3\beta_1$ integrin through Ras/Raf-1/MEK/ERK and calcium/CaMKII signals. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 2865-2873

Illario M, Monaco S, Cavallo AL, Esposito I, Formisano P, D'Andrea L, Cipolletta E, Trimarco B, Fenzi G, Rossi G, 2009. Calcium-calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) mediates insulin stimulated proliferation and glucose uptake. *Cell Signal* **21** 786-792

Jensen KF, 1991. Nuclear and axonal localization of Ca^{++} /Calmodulin-dependent protein kinase type Gr in rat cerebellar cortex. *Proc Natl Acad Sci* **88**, 2850

Kato K, Cox AD, Hisaka MM, Graham SM, Buss JE, and Der CJ, 1992. Isoprenoid addition to Ras protein is the critical modification for its membrane association and transforming activity. *Proc Natl Acad Sci* **89**, 6403-6407, 1992

Kato K, Der CJ, and Buss JE, 1992. Prenoids and palmitate: lipids that control the biological activity of Ras proteins. *Semin Cancer Biol* **3**, 179-188

Kelley GG, Reks SE, Ondrako JM & Smrcka AV, 2001. Phospholipase C(epsilon): a novel Ras effector. *Embo J* **20**, 743-754

Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE and Fagin JA, 2003. High prevalence of 390 BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* **63** 1454-1457

Knauf JA, Kuroda H, Basu S and Fagin JA, 2003. RET/PTC-induced dedifferentiation of thyroid cells is mediated through Y1062 signaling through SHC-RAS-MAP kinase. *Oncogene* **22** 4406-4412

Kodama Y, Asai N, Kawai K, Jijiwa M, Murakumo Y, Ichihara M, and Takahashi M, 2005. The RET proto-oncogene: a molecular therapeutic target in thyroid cancer. *Cancer Sci* **96**, 143-148

Kremenevskaja N, von Wasielewski R, Rao AS, Schofl C, Andersson T and Brabant G, 2005. Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma. *Oncogene* **24**, 2144-2154

Leenhardt L, Grosclaude P & Cherie- Challine L, 2004. Increased incidence of thyroid carcinoma in France: a true epidemic or thyroid nodule management effects? Report from the French Thyroid Cancer Committee. *Thyroid* **14**, 1056-1060

Means AR, VanBerkum MF, Bagchi I, Lu KP, and Rasmussen CD, 1991. Regulatory functions of calmodulin. *Pharmac Therap* **50**, 255-270

Means AR, 2000. Regulatory cascades involving calmodulin-dependent protein kinases. *Mol Endocrinol* **14**, 4-13

Melillo RM, Castellone MD, Guarino V, De Falco V, Cirafici AM, Salvatore G, Caiazzo F, Basolo F, Giannini R, Kruhoffer M, 2005. The RET/PTC-RAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells. *J Clin Invest* **115** 1068-1081

Miller SG, and Kennedy MB, 1986. Regulation of brain type II Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: a Ca²⁺-triggered molecular switch. *Cell* **44**, 861-870

Monaco S, Illario M, Rusciano MR, Gragnaniello G, Di Spigna G, Leggiero E, Pastore L, Fenzi G, Rossi G and Vitale M, 2009. Insulin stimulates fibroblast proliferation through calcium-calmodulin dependent kinase II. *Cell Cycle* **8**, 2024-2030

Morris TA, DeLorenzo RJ, and Tombes RM, 1998. CaMK-II inhibition reduces cyclin D1 levels and enhances the association of p27kip1 with Cdk2 to cause G1 arrest in NIH 3T3 cells. *Experim Cell Res* **240**, 218-227

Muthalif MM, Ljuca F, Roaten JB, Pentapaty N, Uddin MR, and Malik KU, 2001. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and cytosolic phospholipase A2 contribute to mitogenic signaling in myeloblastic leukemia U-937 cells. *J Pharmacol Exp Ther* **298**, 272-278

Nghiem Paul TO, Phyllis Gardner and Howard Schulman, 2002. Interleukin-2 transcriptional block by multifunctional Ca²⁺/calmodulin kinase. *Nature* **371**, 347

Parker DJ, Radhakrishnan I, Yaffe MB, Reyes C, Schulman AI, Cantley LC, Wright PE, Montminy M, 1998. Analysis of an activator:coactivator complex reveals an essential role for secondary structure in transcriptional activation. *Mol Cell* **2**, 353

Picciotto MR, Bertuzzi G, Nairn AC, Edelman AM, 1996. Immunochemical localization of calcium/calmodulin-dependent protein kinase I. *Synapse* **20**, 75

Ramirez MT, Zhao XL, Schulman H, and Brown JH, 1997. The nuclear deltaB isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates atrial natriuretic factor gene expression in ventricular myocytes. *J Biol Chem* **272**, 31203-31208

Richardson RM, Ali H, Pridgen BC, Haribabu B and Snyderman R, 1998. Multiple signaling pathways of human interleukin-8 receptor A. Independent regulation by phosphorylation. *J Biol Chem* **273**, 10690-10695

Rusciano MR, Salzano M, Monaco S, Sapio MR, Illario M, De Falco V, Santoro M, Campiglia P, Pastore L, Fenzi G, Rossi G and Mario Vitale, 2009. The Ca²⁺-calmodulin dependent kinase II (CaMKII) is 1 activated in papillary thyroid carcinoma and mediates cell proliferation stimulated by RET/PTC. *Endocr Relat Cancer*

Russo D, Schlumberger M, du Villard JA, Caillou B, Vigneri P, Wicker R, Chiefari E, Suarez HG, and Filletti S, 1998. Iodine symporter gene expression in human thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 2493-2496

Salvatore D, Barone MV, Salvatore G, Melillo RM, Chiappetta G, Mineo A, Fenzi G, Vecchio G, Fusco A & Santoro M, 2000. Tyrosines 1015 and 1062 are in vivo autophosphorylation sites in ret and ret-derived oncoproteins. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 3898-3907

Santoro M, Melillo RM, Carlomagno F, Fusco A, Vecchio G, 2002. Molecular mechanisms of RET activation in human cancer. *Ann NY Acad Sci* **963**,116–121

Santoro M, Melillo RM, and Fusco A, 2006. RET/PTC activation in papillary thyroid carcinoma: European Journal of Endocrinology Prize Lecture. *Eur J Endocrinol* **155**, 645-653,

Sapio MR, Posca D, Troncone G, Pettinato G, Palombini L, Rossi G, Fenzi G and Vitale M, 2006. Detection of BRAF mutation in thyroid papillary carcinomas by mutant allele-specific PCR amplification (MASA). *Eur J Endocrinol* **154**, 341-348

Schubbert S, Shannon K, Bollag G, 2007. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* **7**,295–308

Schweppe RE, Klopfer JP, Korch C, Pugazhenti U, Benezra M, Knauf JA, Fagin JA, Marlow LA, Copland JA, Smallridge RC, 2008. Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals cross-contamination resulting in cell line redundancy and misidentification. *J Clin Endocrinol Metab* **93**, 4331-4341

Sherman SI 2003 Thyroid carcinoma. *Lancet* **361**, 501-511

Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, Maximo V, Botelho T, Seruca R, Sobrinho-Simoes M, 2003. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* **22**, 4578–4580

Soderling TR, 1999. The Ca-calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Trends Biochem Sci* **24**, 232-236

Smith RJ, Sam LM, Justen JM, Bundy GL, Bala GA, and Bleasdale JE, 1990. Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils: effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell responsiveness. *J Pharmacol Exp Ther* **253**, 688-697

Srinivasan M, Edman CF, and Schulman H, 1994. Alternative splicing introduces a nuclear localization signal that targets multifunctional CaM kinase to the nucleus. *J Cell Biol* **126**, 839-852

- Sun PEH, Myung PS, Maurer RA, 1994. Differential activation of CREB by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes Dev* **8**, 2527
- Takada I, Mihara M, Suzawa M, Ohtake F, Kobayashi S, Igarashi M, Youn MY, Takeyama K, Nakamura T, Mezaki Y, 2007. A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR-gamma transactivation. *Nat Cell Biol* **9**, 1273-1285
- Tokumitsu H, Chijiwa T, Hagiwara M, Mizutani A, Terasawa M, and Hidaka H, 1990. KN-62, 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine, a specific inhibitor of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* **265**, 4315-4320
- Wang SL, Ribar TJ, and Means AR, 2001. Expression of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase IV (CaMKIV) messenger RNA during murine embryogenesis. *Cell Growth Differ* **12**, 351-361
- Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fischer AH, Nikiforov YE, 2003. Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *Am J Clin Pathol* **120**, 71–77
- Zlotnik A and Yoshie O, 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* **12**, 121-127